

**Utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción
Reversa (RT-PCR), para la confirmación de casos de dengue e
identificación del serotipo del virus en muestras clínicas.**

RICARDO FABIAN FÁBREGAS CALAO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2005**

**Utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción
Reversa (RT-PCR), para la confirmación de casos de dengue e
identificación del serotipo del virus en muestras clínicas.**

Proyecto de grado presentado por:

RICARDO FABIAN FÁBREGAS CALAO

Para optar al título de Biólogo

DIRECTOR AD HOC

JORGE HERNÁNDEZ TORRES. P.h.D.

Profesor Auxiliar Escuela de Biología.

Director del Laboratorio de Biología Molecular UIS.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2005

DEDICATORIA

A MIS PADRES PEDRO JOSÉ Y ALCIRA por su apoyo
incondicional en todos los momentos de mi vida

A MI ESPOSA PAOLA XIMENA por ser motor y estímulo en cada
meta propuesta y alcanzada

AL SENTIDO COMÚN...

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer la colaboración prestada a todas aquellas personas que de una u otra forma, me brindaron su apoyo durante la realización de este trabajo, especialmente al Biólogo Nestor Fabián Gálvis y a los Bacteriólogos Sandra Viviana Villamizar y Fabián Mauricio Cortéz y en general a todos los compañeros de trabajo del CINTROP porque además, me brindaron su amistad,

igualmente, deseo agradecer a mis amigos y a mi esposa Paola Ximena, por su apoyo y empuje en los tiempos difíciles,

a la Doctora Laura Andrea Rodríguez Villamizar, por su oportuna y eficiente asesoría, sin la que no hubiese sido posible la finalización de este trabajo,

y finalmente a las siguientes instituciones por la colaboración prestada:
Laboratorio Departamental de Salud Pública y Laboratorio de Genética de la
Universidad Industrial de Santander.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
TABLA DE CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	12
LISTA DE TABLAS	13
LISTA DE ANEXOS	15
RESÚMEN	16
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	18
1. ANTECEDENTES	22
2. OBJETIVOS	26
3. MARCO CONCEPTUAL	27
3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS DENGUE	27
3.2. MARCADORES DE INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE	28
3.3. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOGÉNICOS DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE	32
3.4. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA CONFIRMACIÓN DE CASOS DE DENGUE E IDENTIFICACIÓN DEL SEROTIPO VIRAL.	35
3.4.1. Detección de anticuerpos	36
3.4.1.1. Inhibición de la Hemaglutinación (IH)	36

3.4.1.2. ELISA de captura	37
3.4.2. Aislamiento del virus de suero o sangre infectada	38
3.4.2.1. Inoculación en ratón lactante	39
3.4.2.2. Inoculación intratorácica de mosquitos	40
3.4.2.3. Aislamiento en cultivos celulares	41
3.4.3. Detección del RNA viral	43
3.4.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
3.4.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)	45
3.4.3.3. Estrategias para la amplificación por RT-PCR	49
3.4.3.3.1. RT-PCR con dos enzimas	49
3.4.3.3.2. RT-PCR de una enzima	50
3.4.3.3.3. RT-PCR multiprimer	51
3.4.3.3.4. RT-PCR anidada (Nested RT-PCR)	51
3.5. EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	52
3.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	57
4. MATERIALES Y MÉTODOS DE LABORATORIO	59
4.1. TIPO DE ESTUDIO	59
4.2. POBLACIÓN DE MUESTRAS	59
4.2.1. Criterios de inclusión	60
4.2.2. Criterios de exclusión	60
4.3. TIPO DE MUESTREO	60
4.4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	61
4.5. CONTROLES	61
4.6. DISEÑO METODOLÓGICO	62
4.7. SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR DE ORO (GOLD STANDARD)	64

4.8. MÉTODOS DE LABORATORIO	65
4.8.1. Serología	65
4.8.2. Cultivos celulares	66
4.8.3. Replicación de cepas y virus de referencia	66
4.8.4. Aislamiento primario de virus dengue	67
4.8.5. Reacción en cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)	69
4.8.5.1. Extracción del RNA viral	69
4.8.5.2. Amplificación del RNA viral	70
4.8.5.3. Interpretación de los resultados RT-PCR	73
4.8.5.4. Procedimiento guía del ensayo de amplificación RT-PCR	74
4.8.5.5. Protocolo 1: RT-PCR multiprimer	76
4.8.5.6. Protocolo 2a, Primera ronda: RT-PCR universal	77
4.8.5.7. Protocolo 2b, Segunda ronda: PCR anidada	78
4.8.6. Electroforesis	79
4.8.6.1. Gel de agarosa	79
4.8.6.2. Gel de poliacrilamida	79
4.9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	80
5. RESULTADOS	83
6. DISCUSIÓN	95
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	110
8. BIBLIOGRAFÍA	113

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen por computador del virus dengue.	28
Figura 2. Partículas maduras de virus dengue 2.	28
Figura 3. Relación entre los niveles de anticuerpos IgM y el aislamiento viral (A.V.).	29
Figura 4. Manifestación en el tiempo del virus y los anticuerpos IgM e IgG en personas infectadas de dengue.	31
Figura 5. Modelo de la patogénesis de la fiebre del dengue hemorrágico.	34
Figura 6. Modelo básico de la técnica de amplificación RT-PCR.	45
Figura 7. Diseño metodológico.	63
Figura 8. Organización del genoma del virus dengue.	70
Figura 9. Gel de Poliacrilamida mostrando los productos RT-PCR de los cuatro serotipo virales extraídos de sobrenadantes de referencia.	86

- Figura 10.** Curva control con los dos fragmentos amplificados por los primers D1 y TS2. **87**
- Figura 11.** Gel de Agarosa mostrando los productos RT-PCR extraídos de muestras clínicas. **88**
- Figura 12.** Distribución de temporalidad y frecuencia de los serotipos de dengue detectados por A.V. en el departamento de Santander. **94**

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Estrategias para la amplificación por RT-PCR.	49
Cuadro 2. Cepas de referencia utilizadas en el estudio.	66
Cuadro 3. Procedimiento guía de amplificación por RT-PCR.	74
Cuadro 4. Resumen del protocolo de amplificación RT-PCR multiprimer con la enzima rTth.	76
Cuadro 5. Resumen de la primera ronda de amplificación del protocolo RT-PCR universal con la enzima Amplitaq Gold DNA polimerasa	77
Cuadro 6. Resumen de la segunda ronda de amplificación del protocolo RT-PCR universal con la enzima Amplitaq Gold DNA polimerasa	78
Cuadro 7. Información contenida en la base de datos.	80
Cuadro 8. Descriptores calculados a partir de los resultados obtenidos.	82

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Secuencias de los <i>primers</i> utilizados en este trabajo, para amplificar y tipificar virus dengue.	70
Tabla 2. Modelo de tabla 2x2 para la presentación de resultados.	81
Tabla 3. Muestras incluidas en el estudio, distribuidas por año de ingreso.	83
Tabla 4. Relación de sueros utilizados con los dos protocolos RT-PCR estudiados en este trabajo.	84
Tabla 5. Resultados obtenidos con los protocolos RT-PCR ensayados en muestras de suero, discriminados por serotipo viral.	85
Tabla 6. Datos utilizados en la elaboración de la curva control.	87
Tabla 7. Resumen de los resultados RT-PCR obtenidos con el protocolo 1.	89

Tabla 8. Distribución de los serotipos amplificados con el protocolo 1. **90**

Tabla 9. Resumen de los resultados obtenidos con el protocolo 2. **91**

Tabla 10. Distribución de los serotipos amplificados con el protocolo 2. **92**

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Relación de todos los ensayos desarrollados con las diferentes muestras y protocolos de amplificación.	133
ANEXO 2. Sueros con aislamiento viral positivo y negativo relacionados con los ensayos RT-PCR.	141

RESUMEN

TÍTULO: Utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), para la confirmación de casos de dengue e identificación del serotipo del virus en muestras clínicas*.

AUTOR: RICARDO FABIAN FÁBREGAS CALAO

Palabras clave: Dengue, Vigilancia Epidemiológica, Diagnóstico del dengue, Evaluación de Pruebas Diagnósticas, RT-PCR.

Un sistema de vigilancia efectivo para dengue requiere de técnicas de laboratorio rápidas y confiables que puedan detectar tempranamente la transmisión viral para predecir las epidemias con suficiente anticipación. En este sentido, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) es una alternativa que ha sido utilizada en sistemas de vigilancia en todo el mundo. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el impacto en la confirmación de casos e identificación de serotipos al usar la RT-PCR como parte del programa de vigilancia del dengue en el departamento de Santander. Para esto, fue necesario evaluar las calidades diagnósticas de diferentes ensayos RT-PCR respecto al aislamiento viral como Gold Standard comparándolos además con los obtenidos por ELISA IgM. En el estudio se incluyeron 483 muestras de sueros captadas a través del sistema de vigilancia epidemiológica regional. Los resultados sugieren que: El sistema de vigilancia regional actualmente no permite la adaptación de otros criterios de vigilancia basados en la detección directa del virus como son el aislamiento viral y la RT-PCR. Ninguno de estos protocolos RT-PCR ensayados es apropiado para ser utilizado como prueba de diagnóstico, sino que deben utilizarse sólo como prueba confirmatoria, dada su elevada especificidad (100%). La RT-PCR también puede ser utilizada en la confirmación de cultivos celulares infectados, mejorando la sensibilidad del mismo. El uso del ensayo RT-PCR podría mejorar y confirmar hasta en un 43.75% el diagnóstico de casos inconclusos de dengue, lo cual potencialmente permitiría mejorar la confirmación de casos. El uso de tecnologías diagnósticas como la RT-PCR en combinación con el aislamiento viral y la ELISA IgM, pueden incrementar la seguridad y sensibilidad del diagnóstico por laboratorio de infecciones por dengue.

DIRECTOR: JORGE HERNÁNDEZ TORRES. Ph.D.
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Universidad Industrial de Santander (UIS)

ABSTRACT

Utility of Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) for dengue cases confirmation and identification of the serotype in clinical samples*

AUTHOR: RICARDO FABIAN FÁBREGAS CALAO

Keywords: Dengue, Epidemiological Surveillance, Dengue Diagnostis, Diagnostic Tests Evaluation, RT-PCR.

An effective dengue surveillance system requires rapid and reliable laboratory techniques allowing to the early detection of the viral transmission to predict outbreaks with enough time. In this way, Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) is an alternative widely used around the world. The principal goal in this work was to evaluate the impact in case confirmation and serotype identification by using RT-PCR as a part of the dengue surveillance program in Santander province. In order to make this possible, it was necessary to evaluate the diagnostic qualities of different RT-PCR protocols by comparison with the viral isolation as gold standard and the ELISA IgM assay. In the present study were included 483 serum samples obtained through the regional surveillance system. The results suggest: the regional surveillance system at present do not permits the adaptation to others surveillance criterions based in direct virus detection, as the viral isolation and RT-PCR. None of the RT-PCR protocols has probabilities to be used as a diagnostic test, but only as a confirmatory test, because of its high specificity (100%). RT-PCR assay could be used in confirming infected cells cultures improving the viral isolation sensitivity. Use of the RT-PCR assay could improve and confirm the unfinished serological diagnosis even in 43.75% which potentially could improve case confirmation. The combination of RT-PCR in combination with viral isolation and ELISA IgM can increase the diagnostic accuracy and sensitivity in dengue infections.

DIRECTOR: JORGE HERNÁNDEZ TORRES. Ph.D.
Sciences Faculty
Biology School
Universidad Industrial de Santander (UIS)

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad de origen viral causada por cualquiera de los cuatro serotipos de virus del mismo nombre (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4), transmitidos a los humanos por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (*Stegomyia*) (Gubler, 1988). Esta enfermedad puede manifestarse de una forma leve conocida como Dengue Clásico (DC) o como una forma más severa denominada Dengue Hemorrágico (DH) (Gubler, 1998; Innis, 1995).

Debido a la carencia de una vacuna y tratamiento farmacológico específico de la enfermedad (WHO, 1997), la vigilancia clínica, serológica y virológica se convierten en las principales herramientas para predecir posibles epidemias y tomar las medidas de control apropiadas. Este sistema de vigilancia consiste en la rápida y certera confirmación de los casos sospechosos, determinación de la gravedad del cuadro clínico e identificación del serotipo del virus circulante, entre otros (Guzmán & Kourí, 1996; WHO, 1997). La identificación de los serotipos circulantes es importante teniendo en cuenta que la infección secuencial con serotipos

diferentes es un factor de riesgo para desarrollar DH (Halstead, 1988; Halstead, 1989).

La vigilancia epidemiológica del dengue se soporta en procedimientos de laboratorio específicos. En el departamento de Santander, la confirmación de los casos sospechosos se realiza por medio de la detección de los anticuerpos IgM antidengue mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que mundialmente es el procedimiento más comúnmente utilizado (WHO, 1997). Este ensayo requiere dos muestras de suero: una obtenida durante los primeros días de sintomatología es decir en fase aguda o febril, y otra después de 10 días es decir en fase convalescente. El cambio de resultado negativo a positivo, o el incremento de títulos, entre las dos muestras permite confirmar el caso (Vorndam & Kuno, 1997).

Cuando no es posible obtener muestras pareadas el resultado del ensayo de anticuerpos no es concluyente (Gubler & Sather, 1988; Vorndam & Kuno, 1997). En estos casos, una prueba positiva debe interpretarse como un caso probable y una negativa debe interpretarse de acuerdo al día en que se hizo la colecta. Si la colecta se hizo durante la fase convalescente o afebril de la enfermedad, debe interpretarse como un caso no-probable de dengue (o no dengue) y si la colecta se hizo durante la fase febril o aguda, el caso debe ser considerado como inconcluso por no haber suficiente tiempo para que los

anticuerpos se eleven a títulos detectables por el ensayo (Vorndam & Kuno, 1997).

La identificación de los serotipos de virus dengue se realiza mediante varios procedimientos (Vorndam & Kuno, 1997). El más utilizado es el aislamiento del virus en cultivos de líneas celulares provenientes de mosquitos *Aedes albopictus* (Singh & Paul, 1969). Las células son infectadas con suero, plasma o macrófagos del paciente, colectados en la fase febril y se incuban a temperatura apropiada durante dos semanas para replicación del virus para ser finalmente detectados por inmunofluorescencia indirecta, IFI (IPK, 1997). El éxito del aislamiento depende en gran medida de la manipulación y conservación adecuadas de la muestra que garantizan la viabilidad del virus.

Los mejores resultados se obtienen con sueros procesados el mismo día de la colecta y conservados a bajas temperaturas para ser remitidos al Laboratorio (Chan *et al.*, 1994; Vorndam & Kuno 1997; Yamada *et al.*, 2002), en el actual sistema de vigilancia, no es posible cumplir con estas condiciones, pues generalmente las muestras permanecen por largos períodos de tiempo en las instituciones donde los pacientes son atendidos. Como consecuencia, disminuye la sensibilidad del procedimiento, que sumado a la demora inherente al mismo, hace que éste no se considere el mejor método para diagnóstico del dengue (Kubersky & Rosen, 1977; IPK, 1997; Vorndam & Kuno, 1997).

Una prueba adicional para superar las dificultades de los métodos convencionales de laboratorio, es conocida como la reacción en cadena de la polimerasa, previa transcripción reversa, o RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). La técnica permite detectar RNA viral en una única muestra de suero de fase febril, mediante la amplificación de fragmentos genómicos específicos para cada serotipo (Lanciotti, 1992; Morita *et al.*, 1994; Figueiredo *et al.*, 1998; Deubel, 1990; Gubler, 1998; Rosario *et al.*, 1998). Los ensayos de amplificación de PCR pueden detectar un número pequeño de moléculas de ARN de dengue entre millones de otras moléculas de ARN. Al contrario de la amplificación biológica (cultivos celulares) que es más limitada, el ARN viral puede amplificarse millones de veces en cuestión de pocas horas (Mullis & Faloona, 1987; Lanciotti *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1998).

El presente proyecto de investigación se desarrolló para evaluar la utilidad de la técnica de la RT-PCR como soporte al programa de vigilancia del dengue en el departamento de Santander. Esto, considerando que su implementación permitiría la detección temprana de un número mayor de casos y simultáneamente de más cepas virales. El diseño del estudio incluye la selección de sueros de pacientes con sospecha clínica de dengue, los cuales fueron procesados para confirmar la enfermedad y detectar el virus por métodos convencionales (ELISA-IgM y aislamiento del virus en cultivo celular) y la RT-PCR.

ANTECEDENTES

La primera epidemia de dengue registrada ocurrió en Filipinas entre 1953 y 1954, y durante los siguientes 20 años se convirtió en la primera causa de hospitalización y muerte infantil en la mayoría de los países del Sudeste Asiático. (WHO, 1997; Gubler, 1998). En Latinoamérica, la mayor epidemia de DH ocurrió en 1981 en Cuba con más de 344.000 casos de dengue, de los cuales 10.312 fueron considerados hemorrágicos y 158 fatales, incluyendo 101 niños (Kourí *et al.*, 1983). Desde esa época se vienen informando casos esporádicos, epidemias y brotes explosivos de DH en otros países de Centroamérica y del Caribe (OPS, 1994).

El dengue en Colombia es considerado una enfermedad endémica cuya tasa de incidencia ha sido fluctuante con tendencia al incremento. Desde la aparición del primer caso de Dengue hemorrágico (DH) en diciembre de 1989, en Puerto Berrío (Antioquia), se ha observado en el país una tendencia al rápido incremento en el número de casos, pasando de 1,4 casos por cien mil habitantes en 1994 a 5.17 casos en 1998 (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002). En 1999 se notificaron 1.102 casos con una tasa de 2.64

por cien mil habitantes. Esta situación también se presenta con respecto a la mortalidad, la cual pasó de 0,01 defunciones en 1995 a 0,07 defunciones por cien mil habitantes en 1997 (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002). Un incremento significativo fue nuevamente observado en el 2001 cuando se presentó una nueva epidemia que registró 54.276 casos (OPS, 1994; Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002). Adicionalmente, desde la detección del primer caso de dengue hemorrágico (DH) en 1989, se ha observado una tendencia al incremento en los últimos 6 años, con tasas de 1.4, 5.17, 2.64 y 13.82 casos por cien mil habitantes, en 1994, 1998, 1999 y 2001, respectivamente (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002).

Uno de los departamentos más afectados por el dengue es el Departamento de Santander, (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002) entre otras causas por la cercanía con Venezuela donde una re-emergencia similar ha sido reportada (Salas *et al.*, 1998). De los casi 55.000 casos reportados en el año 2001, Santander aportó el 12% de los casos de DC y el 39.45% de los casos de DH (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002). En el mismo año, Barrancabermeja y los 4 municipios que conforman el área metropolitana de Bucaramanga fueron declarados, entre otros, focos hiperendémicos para dengue (Ministerio de Salud DE COLOMBIA, 2002). En la ciudad de Bucaramanga y su área metropolitana se han presentado epidemias en 1997-1998 y en el 2001 con aumento de 3.4% a 9.6% en la proporción de casos hemorrágicos (Ocazonez *et al.*, 2002)

El monitoreo de los serotipos de virus dengue circulantes en Bucaramanga y su área metropolitana se inició en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP-UIS) en Marzo de 1998, en respuesta a la ocurrencia frecuente de epidemias de dengue en la región. Uno de sus objetivos es contribuir a los programas de control de enfermedades de importancia en nuestro medio, liderados por las Secretarías de Salud, haciendo un aporte importante a la búsqueda de soluciones del problema a nivel local.

El laboratorio de virología CINTROP-UIS, mantiene contacto permanente con el Laboratorio de Virología del Center for Disease Control (CDC) en Puerto Rico, por medio de los Drs. Clark, su Director, y Vordam, Jefe del Laboratorio de Virología, quienes han brindado asesoría técnica y suministrado reactivos.

A nivel local, la participación del Laboratorio de Virología del Centro en el programa de vigilancia del dengue, se ha consolidado a través de: a) desarrollo de la vigilancia virológica mediante el monitoreo de los serotipos de virus dengue circulantes, estableciendo convenios anuales con la Secretaría de Salud Departamental; b) participación en la vigilancia entomológica monitoreando la tasa de infección de mosquitos *Aedes aegypti* mediante convenio establecido con la Secretaría de Salud Municipal y c) participación en el programa “*Vigilancia de Enfermedades Febriles emergentes*” que actualmente se desarrolla bajo la orientación del Instituto

Nacional de Salud de Bogotá, para determinar la frecuencia de dengue en los casos febriles atendidos en diferentes Instituciones de la ciudad.

En vista de la ocurrencia frecuente de epidemias de dengue en el departamento y las dificultades relacionadas con el soporte del laboratorio de diagnóstico, se hace necesario evaluar nuevos métodos que superen las dificultades de los convencionales. La técnica de la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) está siendo usada por Laboratorios de diagnóstico de diferentes países de América y del Sudeste Asiático, donde el dengue es un problema de salud pública (Lanciotti, 1992; Morita *et al.*, 1994; Figueiredo *et al.*, 1997; Deubel, 1997; Gubler, 1998; Rosario *et al.*, 1998). En Colombia sólo existe un reporte sobre detección y tipificación del virus dengue por PCR anidada, pero los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos no son suficientes o satisfactorios (Jaramillo *et al.*, 2002)

Debido a que el resultado puede obtenerse en el mismo día, la prueba establece el diagnóstico tempranamente y por lo tanto puede ser de gran utilidad para el manejo clínico adecuado del caso, lo que evitaría las complicaciones, y además provee información oportuna a los organismos de salud para definir la magnitud de una epidemia. Igualmente es útil para estudios epidemiológicos porque posibilita la detección y tipificación de un mayor número de cepas.

2. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el impacto en la confirmación de casos e identificación de serotipos al usar la RT-PCR para soporte del programa de vigilancia del dengue en el departamento de Santander.

ESPECÍFICOS

1. Comparar la frecuencia de casos de dengue confirmados por serología (anticuerpos IgM) vs. detección del virus mediante la RT-PCR, en los reportados al sistema de vigilancia local.
2. Comparar la sensibilidad de la RT-PCR y del aislamiento viral para monitorear la circulación de serotipos de virus dengue en el Departamento de Santander.
3. Determinar la sensibilidad de dos protocolos de la RT-PCR para detectar virus dengue.
4. Determinar la temporalidad y frecuencia de serotipos de virus dengue que circulan en el Departamento de Santander.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS DENGUE

Los virus del dengue comprenden un grupo de 4 serotipos denominados dengue-1 (DEN-1), dengue-2 (DEN-2), dengue-3 (DEN-3) dengue-4 (DEN-4), los cuales pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, donde se incluyen cerca de 70 virus transmitidos por artrópodos (Westaway & Blok, 1997). Son virus pequeños de aproximadamente 50 nm de diámetro con cápside de simetría icosaédrica, rodeada por una envoltura lipoproteíca derivada de la membrana de la célula huésped (Figuras 1 y 2). El genoma viral es un RNA de cadena simple de 11 kilobases (Kb) y polaridad positiva (Henchal & Putnak, 1990).

El análisis de secuencia de nucleótidos permitió identificar regiones cortas no-codificantes en los extremos 5' y 3' y un *ORF* (*Open Reading Frame* o Marco Abierto de Lectura) de ~10 Kb codificando una única poliproteína (Henchal & Putnak, 1990). Esta poliproteína es fragmentada por enzimas virales y celulares originando 10 proteínas, de las cuales 3 denominadas C, prM-M y E, determinan la estructura del virus y las otras 7 (NS1, NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) participan en la replicación viral (Henchal & Putnak, 1990).

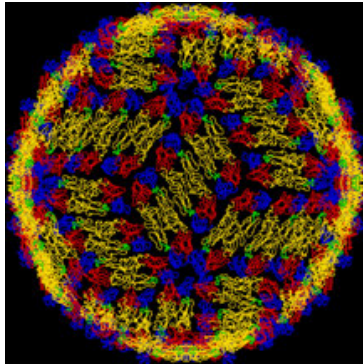


Figura 1. Ilustración por computador del virus dengue que muestra la proteína E. Los tres dominios de la proteína se presentan en azul, verde y amarillo. Tomado de <ftp://ftp.purdue.edu/pub/uns/kuhn.dengue1.jpeg>.

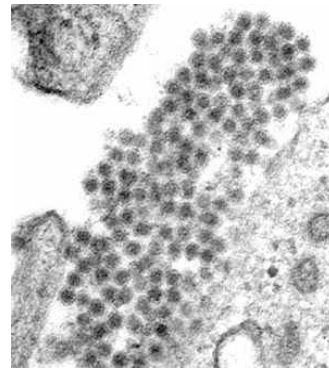


Figura 2. Partículas maduras de virus Dengue-2 que se replican en cultivo celular de cinco días, aumentadas 123.000 veces. Tomado de <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/electron-micrograph.htm>

3.2. MARCADORES DE INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

Luego de que el virus ha infectado un huésped susceptible por un mosquito infectado, sigue un periodo de incubación de 3 a 14 días (4-7 días promedio) después del cual, la persona puede experimentar fiebre acompañada de una variedad de síntomas (WHO, 1997). La viremia se inicia 24 horas antes de la fiebre y finaliza con la desaparición de la misma (Innis, 1995; Gubler, 1998). Estudiando las tasas de aislamiento viral en muestras diarias de pacientes en fase aguda, se ha demostrado que la máxima viremia se presenta aproximadamente entre los días 3 y 4 después del inicio de los síntomas, no

siendo perceptible después del 5º día (Kuno, 1994; Vaughn *et al.*, 1997) (Figura 3). Esta caída del título viral está directamente relacionada con la temperatura corporal e inversamente con el título de anticuerpos circulantes (Gubler *et al.*, 1981; Vaughn *et al.*; 1997) (Figura 4). El final de la viremia marca el final de la etapa febril y la aparición de los anticuerpos. Los anticuerpos IgM e IgG neutralizan virus y como aumentan rápidamente a medida que la fiebre disminuye, interfieren con la recuperación del virus a partir del suero (Gubler *et al.*, 1981; Vaughn *et al.*, 1997) (Figura 3).

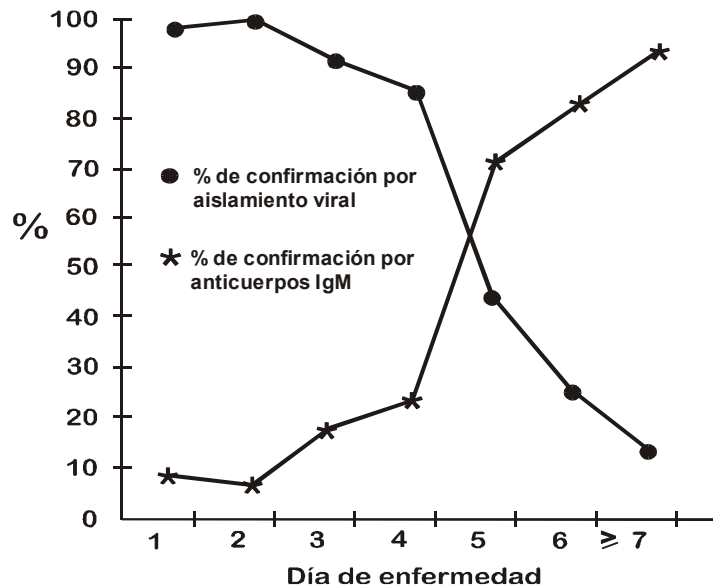


Figura 3. Relación entre los niveles de anticuerpos IgM y el aislamiento viral. Adaptado de Kuno, 1994

Las personas infectadas con virus dengue desarrollan inicialmente una respuesta de anticuerpos tipo IgM y posteriormente una respuesta de anticuerpos IgG. Si el paciente es infectado por primera vez (infección primaria), los anticuerpos IgM se desarrollan rápidamente por lo que estos se

consideran un buen marcador de infección reciente (Kuno, 1994). El título de anticuerpos IgM comienza a subir a niveles detectables desde el 3^{er} día de sintomatología, aunque puede ser detectado un pequeño número de pacientes desde el segundo día (Kuno, 1994) (Figura 3). Normalmente, en el tercer día de enfermedad cerca del 15% de los pacientes desarrollan títulos detectables, cifra que para el quinto día aumenta a un 75% (Chungue *et al.*, 1992). En el 90% de los pacientes la IgM es detectable al sexto día del inicio de los síntomas, pero entre los días 10 y 20 el 99% de los casos son positivos (Kuno, 1994; WHO, 1997; Gubler *et al.*, 1998; Fábregas *et al.*, 2002). Una vez detectados, los anticuerpos IgM suben rápidamente, alcanzan un máximo nivel alrededor de 2 semanas después del inicio de los síntomas y persisten hasta por 60-90 días (Figura 4).

Los anticuerpos IgG en infecciones primarias comienzan a aparecer, usualmente cerca al 10^o día de inicio de síntomas, por lo que no se consideran marcadores de infección aguda. Los títulos se elevan durante algunas semanas y luego permanecen detectables por toda la vida por lo que se consideran marcador de infecciones pasadas (Chungue *et al.*, 1989) (Figura 4). En infecciones secundarias se encuentran presentes en el suero en títulos bastante elevados, antes o simultáneamente con la aparición de los anticuerpos IgM, inmediatamente después del inicio de la enfermedad. (Vaughn *et al.*, 1997; Rigau-Pérez *et al.*, 1998) (Figura 4).

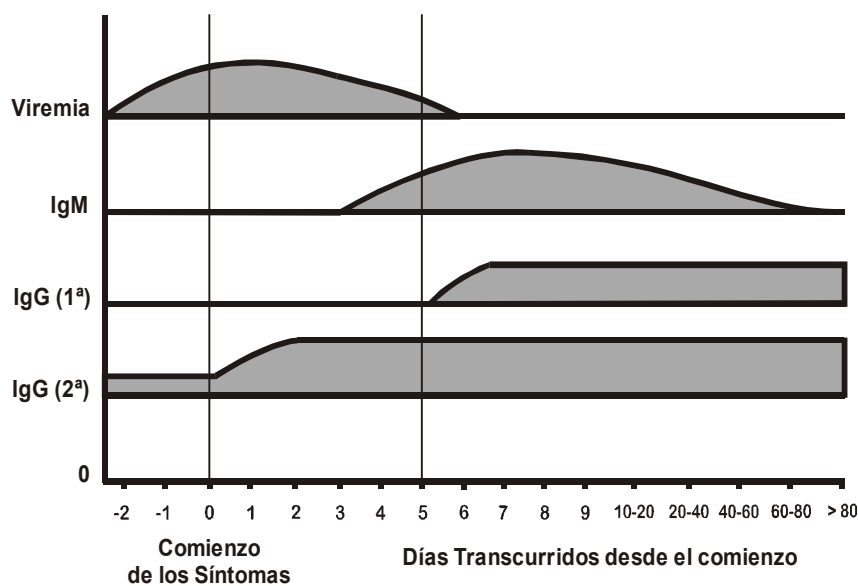


Figura 4. Manifestación en el tiempo del virus y de los anticuerpos IgM e IgG en personas infectadas por el virus del dengue. (1ª)= Infección primaria; (2ª)= Infección Secundaria. Adaptado de OPS (1994)

Dado que los anticuerpos IgM persisten hasta por 3 meses en algunos individuos y que los anticuerpos IgG son prevalentes en áreas de infección endémica, la presencia de estos anticuerpos por sí sola no confirma el caso de dengue, a menos que se pueda demostrar el cambio en los respectivos títulos mediante la detección de los mismos en muestras pareadas (Vorndam Y Kuno, 1997; WHO, 1997).

En el caso de infecciones secundarias, con virus de serotipo diferente a la infección primaria, los anticuerpos IgG de reacción cruzada ("heterotípicos" o secuenciales) son incapaces de neutralizar el virus y al contrario, aumentan el número de macrófagos infectados formando complejos anticuerpos-virus que son internalizados por las células (Halstead *et al.*, 1980; Halstead, 1988).

Mientras la cinética de la producción de anticuerpos IgM es similar a la observada en infecciones primarias, los niveles de estos anticuerpos son dramáticamente más bajos en infecciones secundarias y de hecho un pequeño porcentaje de estos pacientes no alcanza a presentar niveles perceptibles de estos anticuerpos (Kuno *et al.*, 1991; Gubler & Sather, 1988).

3.3. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOGENICOS DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

La infección con virus del dengue puede resultar sin síntomas o como un síndrome febril indiferenciado leve o a veces fatal (OPS, 1994). La forma leve se conoce como Dengue Clásico (DC), que se manifiesta con fiebre, cefalea intensa, dolor retro-orbital, dolores musculares y articulares, con o sin manifestaciones hemorrágicas y trombocitopenia (Nimmannitya, 1999).

Algunos pacientes desarrollan una forma más severa conocida como Dengue Hemorrágico (DH), caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular y capilar, y trombocitopenia severa (Nimmannitya, 1999; Halstead, 1989). Estas alteraciones inducen caída de la presión arterial y edemas por extravasación del plasma y hemorragias. Cuando el paciente no recibe oportunamente sustitución de líquidos se presenta el síndrome del choque por dengue (SCD), que se manifiesta en derrame pleural, ascitis, edemas, hipotensión severa y pérdida del pulso que en algunos casos lleva a la muerte (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Gubler, 1998; Nimmannitya *et al.*, 1999).

Varias teorías para explicar los mecanismos patogénicos responsables del incremento de la permeabilidad vascular observados en DH y SCD han sido propuestas. Una de ellas es conocida como “Facilitación Inmunológica Mediada por Anticuerpos”. Esta fue propuesta por Halstead *et al.*, (1980), quienes sostienen que en el caso de infecciones secundarias con virus de serotipo diferente a la infección primaria, los anticuerpos pre-existentes de reacción cruzada ("heterotípicos" o secuenciales) son incapaces de neutralizar el virus y, al contrario, aumentan el número de macrófagos infectados formando complejos anticuerpos-virus que son internalizados por las células (Figura 5).

Esto se debe a que los complejos virus-anticuerpos son internalizados rápidamente por las células blanco (macrófagos) mediante la porción Fc del anticuerpo receptor que se encuentra en sus membranas (Halstead, 1989; Chen *et al.*, 1996). Por otro lado, por un mecanismo independiente de los anticuerpos, las células dendríticas son infectadas precozmente por el virus, mediante interacciones entre la proteína E y las células blanco que probablemente constituyen una forma de tropismo tisular (Chen *et al.*, 1996). Estos fenómenos activan los linfocitos T CD4+ cooperadores y T CD8+ citotóxicos (CTL) que segregan citoquinas capaces, por ejemplo, de lisar los monocitos infectados. La fagocitosis por los monocitos/macrófagos y la activación celular, llevan a la liberación de algunas citoquinas como el TNF-alfa y el IFN-gamma. La activación del complemento y la acción de las

citoquinas mencionadas, incrementan la permeabilidad capilar provocando así el fenómeno de aumento de la permeabilidad vascular de la FDH/SCD. (Halstead *et al.*, 1980; Halstead, 1989) (Figura 5).

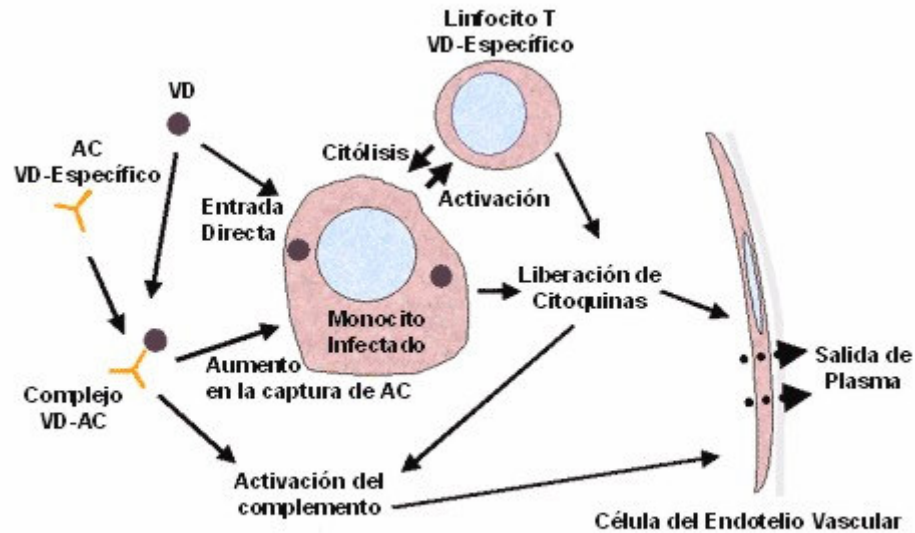


Figura 5. Modelo de la patogénesis de la Fiebre del Dengue Hemorrágico, FDH. Adaptado de [http://www.umassmed.edu/cidvr/faculty/rothman.cfm?start=0&Alan Rothman, M.D.](http://www.umassmed.edu/cidvr/faculty/rothman.cfm?start=0&Alan%20Rothman,%20M.D.)

Una segunda teoría formulada por Rosen (1977), propone que la severidad del dengue está determinada por la virulencia de la cepa. Cambios en el genoma del virus pueden reflejarse en aumento de la replicación viral, llevando a una viremia elevada que resulta en mayor número de células y por lo mismo más severidad.

Estas dos teorías no son mutuamente excluyentes y hay evidencia concluyente de que tanto factores virológicos como factores relacionados con

la inmunología del huésped, están relacionados en la patogénesis de la forma severa de la enfermedad. Por esta razón, Kurane & Ennis, (1997) propusieron un modelo de inmunopatogénesis del dengue, basados en estas hipótesis. En este se considera que gracias a la facilitación inmunológica y virulencia de la cepa, se infecta un número mayor de macrófagos, lo que conlleva a un elevado incremento de la activación de células T y B, resultando en elevados niveles de citoquinas y mediadores químicos responsables del aumento de la permeabilidad vascular. Como consecuencia hay salida de plasma, de proteínas séricas y electrolitos al espacio extravascular, que resulta en choque hipovolémico. Por tanto, cuanto mayor número de células estén infectadas mayor la severidad de la enfermedad (Kurane *et al.*, 1991; Kurane & ENNIS, 1994; Kurane & Ennis, 1997).

Se han postulado otros factores importantes en la patogénesis de FHD/SCD: (1) genotipos del virus altamente virulentos, que se replican a altos títulos, dando por consecuencia el aumento en la respuesta inmunitaria y por ende el aumento de la enfermedad (Rosen, 1986; Rico-Hesse *et al.*, 1997). (2) una predisposición genética a la enfermedad en ciertas poblaciones (Bravo *et al.*, 1987; Gubler, 1998), y otros factores de riesgo como la edad (GUZMÁN *et al.*, 1984), el sexo (Kourí *et al.*, 1983; Guzmán *et al.*, 1984) y la nutrición (Thisyakorn & Nimmannitya, 1993).

3.4. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA CONFIRMACIÓN DE CASOS DE DENGUE E IDENTIFICACIÓN DEL SEROTIPO VIRAL

Los propósitos de los métodos de Laboratorio son básicamente dos: 1) Confirmación de la sospecha clínica para diferenciar el dengue de otras enfermedades con sintomatología clínica similar. 2) Detectar y clasificar el serotipo de virus en muestras de pacientes o en mosquitos, con el fin de proveer un sistema de vigilancia sobre la circulación y transmisión del virus en una zona o región determinada (Vordam & Kuno, 1997; WHO, 1997).

Las pruebas para confirmar el caso de dengue se pueden clasificar en tres grupos: para detección de anticuerpos, aislamiento del virus y detección del RNA viral.

3.4.1. Detección de Anticuerpos

3.4.1.1. Inhibición de la Hemaglutinación (IH). Ésta fue durante muchos años la prueba de rutina para la confirmación de los casos (Nagarkatti *et al.*, 1980). El ensayo requiere muestras pareadas y se basa en la propiedad de los anticuerpos para inhibir la aglutinación de glóbulos rojos de ganso o humanos, inducida por la glicoproteína de la envoltura viral (Chungue *et al.*, 1989; Nagarkatti *et al.*, 1980). La mayor desventaja de la prueba es que las muestras debían ser tratadas con kaolín o acetona para remover los inhibidores no específicos de la aglutinación y posteriormente remover las aglutininas no específicas, por lo que era un ensayo poco práctico y difícil de desarrollar (Nagarkatti *et al.*, 1980; Vorndam & Kuno, 1997). Otra desventaja es la carencia de especificidad, que generalmente hacía imposible la

identificación del serotipo infectante. Sin embargo algunos pacientes con infecciones primarias presentan una respuesta monotípica que generalmente se correlaciona con el serotipo aislado (Gubler & Sather, 1988).

3.4.1.2. Elisa de captura. El ensayo de ELISA de captura es la técnica más utilizada para detectar anticuerpos dada su sensibilidad, rapidez y posibilidad de procesar un gran número de muestras (OPS, 1994). Los anticuerpos presentes en el suero son capturados en microplacas cubiertas con un anti-anticuerpo y luego se ponen en contacto con antígeno de los 4 serotipos de virus dengue. El complejo es detectado usando un anticuerpo anti-dengue marcado con una enzima oxidasa. La aparición de color como resultado de la reacción enzimática indica una reacción positiva (Vordam & Kuno, 1997). Estos ensayos puede detectar anticuerpos IgM e IgG. Se han desarrollado protocolos ELISA-IgG, con una sensibilidad de 83.9 - 96.7% para los cuatro serotipos y kits para la detección de anticuerpos IgM con un 85.5 - 98.4% de sensibilidad (Branch & Levett, 1999; Chungue *et al.*, 1989)

El ELISA-IgM es la técnica de rutina utilizada para confirmar infecciones recientes por virus dengue (OPS, 1994), ya que la detección de anticuerpos IgM son indicio de infección reciente (Vaughn *et al.*, 1997). El factor crítico de la prueba es la interpretación del resultado en relación con el día de la toma de la muestra, luego de inicio de los síntomas (Vordam & Kuno, 1997; Gubler & Sather, 1988). Con muestras tomadas en los primeros 5 días pueden dar resultados falsos negativos, debido a insuficiencia de tiempo para síntesis de

anticuerpos a títulos detectables. Por lo tanto, los resultados negativos en este período deberán ser considerados como indeterminados o inconclusos y una segunda muestra durante la convalecencia deberá ser colectada para observar seroconversión o aumento de 4 veces en el título de anticuerpos (Vordam & Kuno, 1997; Kuno, 1994; WHO, 1997).

Después del 5º día de síntomas los resultados negativos pueden ser interpretados como ausencia de infección por virus dengue (Kuno, 1994; Vordam & Kuno, 1997). Recientemente se ha demostrado la utilidad de la saliva para la detección de anticuerpos IgM e IgG antidengue. Se han observado niveles relativamente comparables a los observados en el suero de los pacientes útiles para el diagnóstico de la infección (Cuzzubbo *et al.*, 1998)

3.4.2. Aislamiento del virus de suero ó sangre infectada

El éxito del aislamiento viral depende en gran medida de las condiciones en que se realice la manipulación y el transporte de las muestras, por lo que se debe garantizar que lleguen rápidamente y en buenas condiciones de temperatura al laboratorio. Para asegurar esto, es conveniente cumplir con requerimientos estrictos que incluyen (Vorndam & Kuno, 1997; WHO, 1997):

- A todos los pacientes con sospecha clínica de infección por dengue debe tomárseles una muestra de sangre venosa en frascos estériles libres de

aditivos, preservativos o anticoagulantes como la heparina y rotularse cuidadosamente con los datos de identificación.

- La separación del suero del coágulo debe ser realizada en el mismo día de obtención de la muestra y asépticamente.
- Las muestras deben ser colectadas máximo antes del 3er día después del inicio de los síntomas, momento en el que se desarrolla la máxima viremia (Vaughn *et al.*, 1997).
- La muestra debe ser enviada al Laboratorio dentro de las 24 horas siguientes a su colecta, o en su defecto ser almacenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Guzmán & Vázquez, 2002), evitando las congelaciones y descongelaciones, para la preservación del virus y mayor éxito de aislamiento.

3.4.2.1. Inoculación en ratón lactante. La inoculación intracraneal en ratones lactantes fué el método original para el aislamiento del virus dengue y actualmente es considerado el método menos sensible (Guzmán *et al.*, 1984; Guzmán & Kourí, 1996). Surgió en la década de los 40. Consiste en inocular por vía intracerebral, ratones de 1 o 2 días de edad con 20 μl de muestra de suero, observándolos durante 3-4 semanas para identificar síntomas de encefalitis y parálisis (Boonpucknavig *et al.*, 1981). Este método tiene la desventaja de que algunas cepas del virus no producen enfermedad en el ratón, por lo que es necesario hacer pases ciegos (Guzmán *et al.*,

1984). Es considerado dispendioso y de baja sensibilidad si se compara con otras técnicas (Vorndam & Kuno, 1997; Innis, 1995; Guzmán *et al.*, 1984).

3.4.2.2. Inoculación intratorácica de mosquitos. Este método se desarrolló en los años 70 y revolucionó el aislamiento del virus del dengue (Guzmán & Kourí, 1996). Es el procedimiento más sensible y práctico para aquellos laboratorios que pueden disponer de un insectario (Rosen & Gubler, 1974). Los mosquitos adultos o larvas son inoculados intratorácicamente con una muestra de suero o extracto de tejido usando un capilar de vidrio. Después de 12 días la presencia del virus puede identificarse usando Inmunofluorescencia o ELISA (Kuno, 1990), o mediante la RT-PCR (Chungue *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 1998). Con este procedimiento se han obtenido buenos resultados usando las especies de mosquitos *Aedes albopictus* o *A. Aegypti*, *Toxorhynchites splendens* y *Tx. Amboniensis*, estos últimos con la ventaja de que no son hematófagos (Rosen & Gubler, 1974; Vorndam & Kuno, 1997).

Bajo condiciones óptimas de tratamiento de las muestras se obtienen tasas de aislamiento hasta del 98% con relación a la confirmación serológica (Vaughn *et al.*, 1997). Las desventajas de este método son el alto costo que supone el montaje del insectario, el tiempo para obtener un resultado y los riesgos biológicos que supone mantener zancudos infectados.

3.4.2.3. Aislamiento en cultivos celulares. Dadas las desventajas de los métodos anteriores surgió el aislamiento en cultivos de células inicialmente en líneas celulares de mamífero como BHK-21, VERO y LLCMK2 (Vorndam & Kuno, 1997). Sin embargo estudios realizados establecieron que aunque la sensibilidad de estos cultivos era generalmente mayor que la obtenida con la inoculación intracraneal de ratones, no superaba la inoculación en mosquitos (Rosen & Gubler, 1974). Esto originó la creación de líneas celulares de mosquitos

La demostración de Singh y Paul en 1969 de que los 4 serotipos podían ser multiplicados en una línea celular obtenida a partir de larvas de mosquitos *Aedes albopictus*, representó un avance en el aislamiento de este virus (Singh & Paul, 1969). A partir de estos hallazgos, otras líneas celulares de mosquitos se han desarrollado como la AP-61 proveniente de *Aedes pseudoscutellaris* (Varma *et al.*, 1974) TRA-284 de *Toxorhynchitesamboinensis*, (Kuno *et al.*, 1985) y C6/36 HT derivado del mosquito *Aedes Albopictus* (Tesh, 1979).

La línea C6/36 es la más utilizada por todos los Laboratorios de diagnóstico, por su facilidad de mantenimiento, estabilidad y sensibilidad. (Vorndam & Kuno, 1997). Para el aislamiento, las monocapas celulares crecidas en tubos de plástico o vidrio son infectadas con la muestra e incubadas hasta por 14 días para replicación del virus. La identificación del serotipo se realiza por Inmunofluorescencia independientemente de la aparición de efecto citopático

(Kubersky & Rosen, 1977; IPK, 1997). Se han reportado tasas de aislamiento del 36% de positividad sobre los casos confirmados por serología (Kuno *et al.*, 1985). Sin embargo, este sistema sigue siendo menos sensible que la inoculación intratorácica de mosquitos (Vorndam & Kuno, 1997).

En general, el principal problema asociado con la identificación de los virus del dengue en los cultivos celulares es la pobre replicación del virus. Por tal razón, la identificación en la siembra primaria es en algunos casos imposible, por lo que se necesitan 1 o 2 pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar la concentración viral (Soler *et al.*, 1985).

La sensibilidad del aislamiento viral en cultivo de células también varía con la calidad de la muestra. En sueros colectados a través de un sistema de vigilancia establecido, los aislamientos son exitosos en 5% (Ocazonez *et al.*, 2002) hasta 36% (Vorndam & Kuno, 1997) de los casos. Cuando el suero es procesado en las 6 horas siguientes a su colecta, el virus puede aislarse del 87.5 a 100% de los casos (Vorndam & Kuno, 1997). Además, el día en que la muestra fue obtenida y la temperatura a la que la muestra fue almacenada, influyen significativamente en el éxito del aislamiento. Los mejores resultados en sueros almacenados, se obtienen con sueros de 2º y 3º día de síntomas que son almacenados a -70 °C (Yamada *et al.*, 2002). Los cambios de temperatura alteran la conformación estructural del virus y por lo mismo la posibilidad de unirse al receptor celular (Chan *et al.*, 1994; De Paula *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002).

Los inconvenientes del aislamiento en cultivo de células son: a) el suero es citotóxico para la línea celular por lo que la muestra de suero debe ser aplicado al tubo de cultivo con la más baja dilución posible para evitar el desprendimiento de la monocapa celular (Kuno *et al.*, 1985); b) Los anticuerpos IgM e IgG, neutralizan el virus, interfiriendo con su recuperación a partir del suero (Vaughn *et al.*, 1997) (Figura 2); c) la confirmación del caso toma alrededor de dos semanas (Tesh, 1979; Kuno *et al.*, 1985; Kubersky & Rosen, 1977); d) la baja sensibilidad del método cuando la obtención de las muestras no depende directamente del laboratorio que practica el ensayo (De Paula *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002).

3.4.3. Detección del RNA viral

Dado que los métodos convencionales presentan problemas relacionados con dificultades técnicas, sensibilidad, demora en la obtención de los resultados y dependencia de dos muestras, surgieron técnicas moleculares para la detección de virus dengue. El primer ensayo, fue la hibridización de RNA extraído de sobrenadantes de cultivos celulares y mosquitos infectados, con sondas radioactivas (Henchal *et al.*, 1987) y no radioactivas (Khan *et al.*, 1987). Aunque con las primeras fue más sensible, el ensayo mostró no ser muy útil para identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que la muestra se someta a una previa amplificación (Henchal *et al.*, 1987; Deubel *et al.*, 1990). Dada la baja sensibilidad, esta técnica no fue evaluada

extensivamente para aplicaciones diagnósticas. Como consecuencia, surgió una nueva aproximación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.4.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue inventada en 1987 y es el método de amplificación de ácidos nucleicos más utilizado y mejor desarrollado (Mullis & Faloona, 1987).

La técnica incluye ciclos repetidos de amplificación de secuencias nucleotídicas seleccionadas y cada ciclo consta de tres pasos: desnaturalización del DNA, en el cual las cadenas son separadas; alineación, en la cual a baja temperatura se une a los iniciadores o primers específicos a la secuencia seleccionada y finalmente, la fase de extensión, en la cual la enzima DNA Polimerasa extiende las secuencias entre los primers. Después de cada ciclo la cantidad de DNA teóricamente se duplica exponencialmente de forma que la cantidad inicial de muestra puede aumentarse a cualquier cantidad requerida (Saiki *et al.*, 1988). Todo el proceso es desarrollado en un termociclador automático y posteriormente los productos de la reacción son visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

3.4.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction, RT-PCR).

Se han desarrollado numerosas modificaciones del procedimiento estándar de la PCR algunas de éstas modificaciones han expandido la capacidad diagnóstica de la PCR. Una de ellas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), que ha posibilitado la detección de blancos de RNA como virus RNA (Kuno, 1988). En este caso, el RNA es primero convertido en DNA o DNA complementario (cDNA) por la acción de la enzima transcriptasa reversa (RT), para después ser amplificado por PCR (Sambrook *et al.*, 1989) (Figura 6).

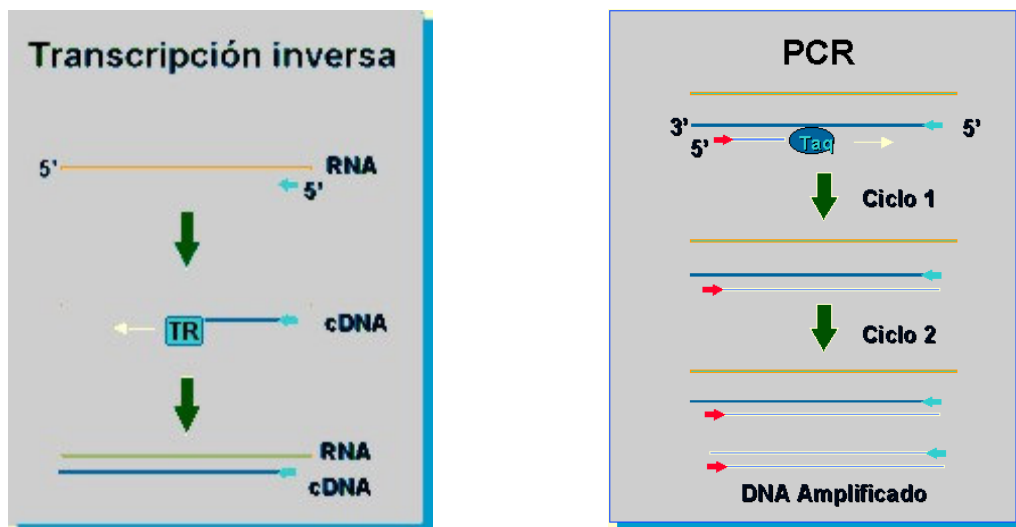


Figura 6. Modelo básico de la técnica de amplificación RT-PCR

Es importante tener en cuenta que la máxima conversión del RNA en cDNA es crítica para el éxito del ensayo, de manera que este último pueda servir como sustrato para los pasos de amplificación. Para esto es crucial la selección de las enzimas y de los *primers* y las diferentes posibilidades de iniciar la reacción de síntesis del cDNA (Sambrook *et al.*, 1989; Cha & Thilly, 1995).

Las enzimas utilizadas en la RT-PCR son DNA Polimerasas obtenidas de bacterias y transcriptasas reversas obtenidas de retrovirus. Entre las primeras, se encuentra la Amplitaq Gold DNA Polimerasa (*Applied Biosystems*), que es una enzima genéticamente mejorada de la *Taq* DNA Polimerasa originalmente purificada de *Thermus aquaticus* (Saiki & Gelfand, 1989). Existe una gran variedad de enzimas transcriptasas reversa útiles para la síntesis del cDNA. Entre estas se incluyen la AMV-RT, la MuLV-RT, la RAV-2 y las enzimas termoestables Tth y Tfl (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

La AMV RT es una enzima purificada del virus de la mieloblastosis aviar, conformada por dos polipéptidos encargados de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA y de una fuerte actividad RNasa H⁻. Esta enzima trabaja más eficientemente a pH de 8.3 y entre 42 - 55 °C, lo cual ayuda a eliminar problemas asociados con estructuras secundarias presentes en la muestra (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

La enzima MuLV-RT es una transcriptasa reversa aislada del virus de la leucemia murina. Trabaja más eficientemente a pH 7.6 y está conformada por un sólo polipéptido que tiene actividad de polimerización y de RNasa H⁻ comparativamente menor a la AMV-RT (Dieffenbach & Dvskler, 1995). Esta débil actividad RNasa es una ventaja cuando la meta es sintetizar cDNA a partir de largas secuencias de RNA. También hay dos mutantes RNasa H⁻ de esta enzima, conocidos como SuperScript y SuperScript II que han sido usados exitosamente en reacciones de RT-PCR (Dieffenbach & Dvskler, 1995). La RAV-2, es una enzima purificada del virus del sarcoma de Rous y tiene propiedades similares a las de la AMV-RT, mostrando un buen desempeño en reacciones RT-PCR (Kuno *et al.*, 1998).

Una enzima capaz de realizar transcripción reversa y polimerización del ADN es la *Tth* polimerasa derivada de la bacteria *Thermus thermophilus* (Perkin-Elmer), que es dependiente de DNA y RNA. Las reacciones son posibles mediante el uso de un buffer con Bicina en presencia de iones Mn⁺⁺ que son compatibles con la transcripción inversa y con la PCR. Esta enzima tiene una vida media de 20 min a 95 °C tiempo suficiente para realizar más de 30 ciclos de amplificación a más de 70 °C (Myers & Gelfand, 1991; Chiochia & Smith, 1997).

La elección de los primers para la síntesis del cDNA depende en gran medida de la aplicación específica de la RT-PCR. La especificidad de cada *primer* influye directamente en la cantidad de cDNA sintetizado. La síntesis

del cDNA puede hacerse usando tres diferentes tipos de primers (Dieffenbach & Dvskler, 1995). El primer tipo son los “random hexamers” que son oligonucleótidos de 6 a 10 pb usados cuando un RNA es particularmente difícil de copiar en su totalidad, debido a la presencia de secuencias que impiden la transcripción completa de la hebra. Con estos primers todas las secuencias de RNA presentes en la población sirven como muestra en la síntesis del cDNA inicial y la especificidad de la reacción dependerá de los primers de la PCR. Para maximizar la cantidad de cDNA sintetizado usando random hexamers, la tasa de primers/RNA debe determinarse empíricamente con cada RNA preparado (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

Un segundo tipo de primers son los oligonucleótidos complementarios a la secuencia del RNA blanco. Como la reacción de PCR utiliza dos primers específicos, la síntesis del cDNA inicial puede desarrollarse usando el *primer* que hibridiza en el extremo 3' del RNA. La ventaja de usar este *primer* es que sólo el cDNA esperado es producido, lo cual aumenta la especificidad en la PCR (Dieffenbach & Dvskler, 1995). El tercer tipo de primers son los Oligonucleótidos (dT), que se usan cuando el RNA a amplificar es del tipo mRNA, pues éstos hibridizan con las colas poli (A) presentes en los extremos 3' (Frohman *et al.*, 1988).

3.4.3.3. Estrategias para la amplificación por RT-PCR. Estas estrategias pueden ser definidas de acuerdo al número de enzimas y según el protocolo de amplificación de la siguiente forma (Cuadro 1):

Cuadro 1. Estrategias para la amplificación por RT-PCR

Según el número de enzimas:	Según el protocolo de amplificación
RT-PCR con dos enzimas	RT-PCR Multiprimer
RT-PCR con una enzima	Nested RT-PCR

3.4.3.3.1. RT-PCR con dos enzimas. En este procedimiento se utiliza una enzima transcriptasa reversa y una DNA polimerasa en un ensayo de dos etapas. La primera etapa es la transcripción reversa donde la síntesis de cDNA se desarrolla utilizando el tampón y temperatura específicos para la transcriptasa. Para la segunda etapa, las condiciones de reacción se modifican para asegurar la amplificación del cDNA por la DNA polimerasa, utilizando un segundo tampón y otras condiciones de procesamiento de las muestras (Sambrook *et al.*, 1989; Dieffenbach & Dvskler, 1995). La RT-PCR con 2 enzimas presenta dos grandes ventajas: la primera es que el cDNA obtenido en un solo ensayo puede ser usado para desarrollar variedad de ensayos de amplificación, usando diferentes primers para secuencias diversas. Estos productos amplificados se pueden emplear para diversos propósitos como clonaje, secuenciamiento, etc. La segunda ventaja es que ofrece una mayor eficiencia de la amplificación, y por lo mismo mayor

sensibilidad, considerando que se asegura al máximo la actividad enzimática al suministrar las condiciones iónicas y de temperatura para cada una de ellas. La principal desventaja de este método es que se incrementan el riesgo de contaminación y de falsos positivos, debido a la manipulación, especialmente cuando se analiza un número grande de muestras simultáneamente (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

3.4.3.3.2. RT-PCR de una enzima. A diferencia del anterior, en este ensayo se utiliza una única enzima DNA polimerasa con actividad de transcriptasa reversa y estable a temperaturas mayores de 70 °C. Esta enzima es la rTth (*Thermus thermophilus*) DNA polimerasa.

Las ventajas de usar rTth son significativas: Aumenta el rendimiento y la especificidad de la reacción, ya que ésta se desarrolla a más de 70 °C posibilitando el uso de primers con una T_m superior y además eliminando los problemas relacionados con estructuras secundarias del RNA (Dieffenbach & Dvskler, 1995). Otra ventaja es que al haber un solo tipo de buffer, se reducen significativamente el tiempo de manipulación de las muestras y la probabilidad de contaminación de las mismas. También hay evidencias de que las reacciones que utilizan la enzima Tth son más resistentes a inhibidores presentes en muestras biológicas u otros como residuos de fenol presentes en la muestra (Poddar *et al.*, 1998).

El principal inconveniente de este método es que no es tan sensible como el de dos enzimas debido a que la actividad enzimática de la *Tth* polimerasa es menor comparada con la *Taq* polimerasa (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

3.4.3.3.3. RT-PCR Multiprimer. Es una técnica de amplificación en la cual se utilizan varios sets de primers en un mismo tubo de reacción para amplificar distintos blancos específicos potencialmente presentes en la muestra. De esta forma una sola mezcla de reacción puede amplificar más de una secuencia de ácido nucleico (Kuno, 1998). Una de las desventajas de la técnica es la gran competición entre los primers, lo que disminuye la eficiencia y aumenta la posibilidad de amplificar falsos negativos. En la PCR multiprimer el costo de los reactivos y su tiempo de preparación son mucho menores que en un sistema de PCR uniplex para amplificar varios blancos. Esto constituye una ventaja si se trata de procesar muestras para diagnóstico a gran escala (Dieffenbach & Dvskler, 1995; Cusi *et al.*, 1994).

3.4.3.3.4. RT-PCR Anidada (Nested PCR). Consiste en detectar un fragmento del genoma del virus común a los cuatro serotipos mediante RT-PCR con dos enzimas en un mismo tubo (primera ronda o RT-PCR Universal). La identificación del serotipo se hace con otra PCR (de anidación) y los *primers* antisentido específicos para cada uno de los cuatro serotipos del virus dengue que pueden ser fácilmente distinguidos mediante electroforesis (Segunda Ronda o RT-PCR de anidación) (Harris *et al.*, 1998; Rosario *et al.*, 1998). Esta estrategia es aconsejable cuando hay problemas

relacionados con la cantidad y calidad de la muestra a amplificar, porque aumenta la sensibilidad debido al doble proceso de amplificación (Elrich *et al.*, 1991; Dieffenbach & Dvskler, 1995). La principal desventaja de este procedimiento es que los dos procesos de amplificación aumentan el costo y tiempo necesarios para obtener los resultados (Harris *et al.*, 1998; Dieffenbach & Dvskler, 1995).

3.5. EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

La base de la evaluación de pruebas yace en estimar las probabilidades de los resultados o ciertas combinaciones de estas probabilidades. Aquí se incluyen los descriptores sensibilidad, especificidad, los valores predictivos y la eficiencia (Kraemer, 1992). Existen tres diferentes tipos de muestreo denominados muestreo de corte transversal, muestreo prospectivo y muestreo retrospectivo (Kraemer, 1992). Estos muestreos pueden ser utilizados para evaluar una prueba comparada con un diagnóstico de referencia y definen la manera de calcular los valores de sensibilidad, especificidad y los valores predictivos sin ningún sesgo (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997).

En el muestreo de corte transversal, a todos los sospechosos de la entidad en estudio se les practica, en forma independiente, el diagnóstico y la prueba que se está evaluando. Es decir, en una muestra de (N_0) individuos

representativos de la población, se realizan (N_0) diagnósticos y en forma independiente N_0 pruebas (Orozco & Camargo, 1997).

En el muestreo prospectivo, a todos los individuos de la muestra representativa de la población (N_0) se les realiza la **prueba**, así obtenemos Q y Q' (Complemento de Q), de manera directa sin sesgo y a una muestra aleatoria (N_1) de positivos y (N_2) de negativos en la prueba, se les realiza el **diagnóstico**. De nuevo: (N_1) + (N_2) < (N_0), (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997). La proporción de diagnósticos positivos entre los positivos en la prueba (N_1) es el VPP y la proporción de diagnósticos negativos entre los negativos en la prueba (N_2) es el VPN. En este tipo de muestreo, el nivel de la prueba Q, su complemento Q' y los valores predictivos positivo y negativo VPP y VPN, son los únicos datos sin sesgo que se pueden obtener directamente con este tipo de muestreo. Por definición, (N_1) + (N_2) < (N_0), lo cual disminuye costos y riesgos (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997).

En el muestreo retrospectivo, a todos los individuos de la muestra representativa de la población N_0 se le realiza el **diagnóstico**, con lo cual obtenemos P y P' sin sesgo. De los individuos con diagnóstico positivo, se toma una muestra aleatoria (N_1) y de los individuos con diagnóstico negativo se toma una muestra aleatoria (N_2) y a estas dos muestras se les aplica la **prueba** que se va a evaluar. En este tipo de muestreo, la sensibilidad y la especificidad son valores condicionales que describen el comportamiento de la prueba en relación con el diagnóstico. Los estimadores S y E no presentan

sesgo y junto con P y P' son la únicas probabilidades que podemos calcular directamente de los datos obtenidos. De nuevo: $(N_1) + (N_2) < (N_0)$, con lo que se disminuyen costos y riesgos (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997).

De acuerdo al muestreo retrospectivo, los cálculos correspondientes son (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997):

Prevalencia (P): es el nivel del diagnóstico y equivale a la proporción de diagnósticos positivos. Al especificar una población la prevalencia es el punto de importancia. Cabe aclarar que aquí, el término prevalencia no hace referencia a la prevalencia del desorden en la población, sino a la prevalencia de diagnósticos positivos en la población. De hecho, esta prevalencia puede cambiar dramáticamente dentro de la misma población sólo cambiando el criterio diagnóstico.

Complemento de P (P'): hace referencia a la proporción de diagnósticos negativos.

$$P' = 1 - P$$

Sensibilidad (S): es la proporción de pacientes con un diagnóstico positivo que tienen un resultado positivo con la prueba ensayada.

Para obtener la S basta con calcular la proporción de individuos con prueba positiva entre los individuos con diagnóstico positivo.

Especificidad (E): Es la proporción de pacientes con un diagnóstico negativo que tenga un resultado negativo con la prueba ensayada. Para obtener la E basta con calcular la proporción de individuos con prueba negativa entre los individuos con diagnóstico negativo.

Una fuerte correspondencia entre una prueba y un diagnóstico clínicamente válido, demuestra que la prueba es un indicador válido para determinar la presencia del desorden. Por otro lado, una débil correspondencia entre la prueba y el diagnóstico presumiblemente válido sugiere debilidad o invalidez de la prueba.

Con la S, E y P es posible calcular los VP, FN, FP y VN, que son los cuatro posibles resultados al diagnosticar y probar una técnica en un paciente o muestra en particular (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997):

Verdaderos Positivos (VP): cuando los resultados del diagnóstico y de la prueba son positivos:

$$\mathbf{VP = P \times S}$$

Falsos Negativos (FN): cuando el resultado del diagnóstico es positivo y la prueba es negativa:

$$\mathbf{FN = P \times (1 - S)}$$

Falsos Positivos (FP): cuando el resultado del diagnóstico es negativo y la prueba es positiva:

$$FP = P' \times (1 - E)$$

Verdaderos Negativos (VN): cuando los resultados del diagnóstico y de la prueba son negativos:

$$VN = P' \times E$$

Con estos datos podemos calcular indirectamente Q y los VPP y VPN (Kraemer, 1992; Orozco & Camargo, 1997):

Nivel de la prueba (Q): equivale a la proporción de pruebas positivas.

$$Q = (P \times S) + (P' \times (1 - E))$$

Complemento de Q (Q'): hace referencia a la proporción de pruebas negativas.

$$Q' = 1 - Q$$

Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad de tener un diagnóstico positivo entre los casos que tienen una prueba positiva:

$$VPP = P \times S / Q$$

Valor Predictivo Negativo (VPN): Es la probabilidad de tener un diagnóstico negativo entre aquellos casos con prueba negativa:

$$\mathbf{VPN} = P' \times E / Q'$$

Los valores predictivos son probabilidades condicionales que describen el comportamiento del diagnóstico en relación con la prueba.

Eficiencia (EF): se define como la probabilidad de acuerdo entre la prueba ensayada y el diagnóstico.

$$\mathbf{EF} = VP + VN / No$$

Todo reporte de sensibilidad y especificidad de una prueba debe estar acompañado de sus respectivos **índices de calidad** $k(1,0)$ y $k(0,0)$ también son conocidos como coeficientes kappa ponderado y son los que ponderan los resultados de sensibilidad y especificidad de acuerdo al nivel de la prueba (Kraemer, 1992).

$$\mathbf{k(1,0)} = (S - Q) / Q'$$

$$\mathbf{k(0,0)} = (E - Q') / Q$$

3.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Caso Sospechoso:** aquellos que según criterio médico padecían la enfermedad, es decir casos febriles con algún padecimiento osteomuscular y/o hemorrágico al momento de la consulta, pero sin foco de infección aparente.

- **Caso Inconcluso:** fueron aquellos casos sospechosos con resultado negativo del ELISA-IgM en suero colectado hasta el 5° día de síntomas y con ensayo de aislamiento viral negativo.
- **Caso Probable:** aquellos casos sospechosos con resultado positivo del ELISA-IgM en suero no pareado y con ensayo de aislamiento viral negativo.
- **Muestra clínica:** es todo aquel suero obtenido de un paciente sospechoso de dengue.
- **Muestra o caso confirmado de dengue:** es aquella muestra o suero de paciente sospechoso, en la que se demostró la existencia de virus al presentar ensayo de aislamiento viral positivo.
- **Sobrenadante:** es el medio de crecimiento de un cultivo celular que ha sido exitosamente infectado con el virus. Este contiene el virus en abundancia y es la forma de almacenar y preservar las diferentes cepas aisladas.
- **Virus o cepas de referencia:** normalmente son sobrenadantes de cepas utilizadas como control o para almacenamiento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS DE LABORATORIO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

Adaptación de tecnología, Evaluación de tecnología diagnóstica.

4.2. POBLACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de suero utilizadas en este trabajo, fueron captadas por el sistema de vigilancia epidemiológica de la Secretaría de Salud Departamental, entre 1999 y 2002 y tomadas durante la fase febril en el momento de consulta del paciente. La colecta de sangre y obtención del suero fueron realizadas en la institución de origen y por su propio personal. Las muestras fueron regularmente remitidas de las diferentes instituciones de salud pública y privada de todo el departamento, al laboratorio de referencia de la Secretaría de Salud Departamental (Laboratorio Departamental de Salud Pública, LDSP). Todas las muestras debían presentar ficha clínico-epidemiológica que contiene datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

Las muestras fueron seleccionadas entre las que ya se encontraban almacenadas en el laboratorio al inicio del estudio y de las que se seguían

captando por el sistema de vigilancia virológica, teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión y de exclusión:

4.2.1. Criterios de inclusión.

- Caso con sospechosa clínica de dengue, con ensayo de anticuerpos IgM y ensayo de aislamiento viral, cuya muestra haya sido tomada dentro de los cinco primeros días de fiebre.
- Caso fatal de dengue con ensayo de anticuerpos IgM y ensayo de aislamiento viral independientemente de los resultados obtenidos en estos ensayos.

4.2.2. Criterios de exclusión:

- Presentar más de cinco (5) días de enfermedad febril al momento de la consulta médica o algún foco de infección aparente según la información relacionada en la ficha clínica (ej: otitis media, neumonía, meningitis, anemia, alguna enfermedad crónica o signos vitales inestables).

4.3. TIPO DE MUESTREO

Muestreo retrospectivo.

Este tipo de muestreo fue el más indicado, ya que en el momento de iniciar la investigación, existían en el laboratorio de virología del CINTROP muchas muestras de suero a las que se les había practicado el ensayo de

aislamiento viral. Las muestras para análisis, con aislamiento viral negativo fueron escogidas aleatoriamente del total de muestras con aislamiento viral negativo.

4.4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el laboratorio del CINTROP, las muestras fueron rotuladas con un código interno que consta de los dos últimos números del año de captación y el consecutivo del orden de entrada al laboratorio. Por ejemplo, la muestra 00-020: muestra número veinte captada por el laboratorio en el año 2000. Las muestras podían ser procesadas de inmediato o se almacenaban en viales estériles a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta procesarlas para intentos de aislamiento viral y RT-PCR. Todos los procedimientos, inventarios y datos adicionales eran registrados de forma inmediata y manual. Como una forma evitar el sesgo que pudiera surgir por conocer el diagnóstico de las muestras a ensayar, la escogencia de las mismas y el desarrollo de los subsecuentes ensayos fueron llevados a cabo por personal diferente en el laboratorio (Kraemer, 1992).

4.5. CONTROLES

Estos fueron los controles utilizados durante la estandarización y el procesamiento de muestras por la técnica de RT-PCR:

Positivo: sobrenadante de cultivos celulares C6/36 infectados con cada uno de los 4 serotipos de virus dengue y suero de pacientes de donde el virus fue previamente aislado en cultivo.

Negativo: sobrenadante de cultivos celulares no infectados y suero de individuo sano.

De reacción: contiene todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción de la muestra que era reemplazada por agua.

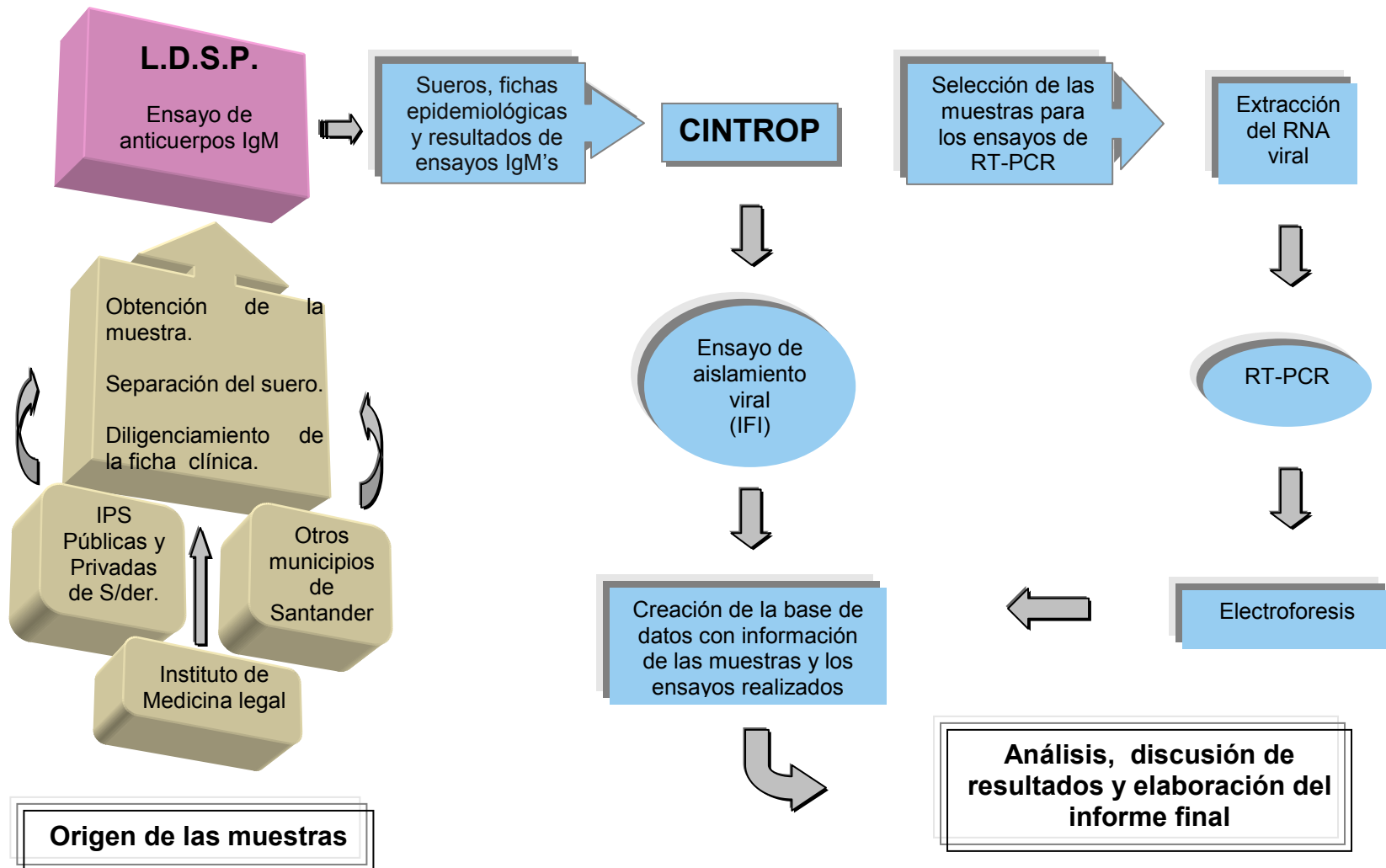
De extracción: muestra negativa a la cual se le realiza todo el proceso de purificación de ácido nucleico y PCR. No debe aparecer ninguna banda de amplificación a nivel de este control.

Control de Inhibición: consiste en adicionar RNA viral al ácido nucleico purificado de una muestra negativa, de existir algún inhibidor de la actividad de la polimerasa de DNA la banda esperada no aparecerá.

4.6. DISEÑO METODOLÓGICO

En la figura 7 se presenta un resumen del diseño metodológico.

Figura 7. Diseño metodológico



4.7. SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR DE ORO (GOLD STANDARD)

En este estudio, todas las muestras fueron diagnosticadas al momento de la consulta médica como casos de dengue por el personal médico de las diferentes instituciones de salud.

Dado que sólo se contaba con una muestra de suero de fase aguda de cada paciente, el resultado positivo o negativo del ensayo de anticuerpos IgM no podía considerarse como un resultado concluyente, teniendo en cuenta que lo que permite confirmar el caso es el cambio del resultado negativo a positivo, o el aumento en el título de anticuerpos entre muestras pareadas. Esta interpretación directa del resultado del ensayo de anticuerpos es un error cometido y aceptado en el sistema de vigilancia epidemiológica local (Vorndam & Kuno, 1997; Fábregas *et al.*, 2002; WHO, 1997).

Cabe recordar que el laboratorio de virología del CINTROP tiene una considerable experiencia en la vigilancia virológica del dengue en la región, contando con el personal, los equipos y materiales adecuados para tal fin desde el año de 1998.

Por todo lo anterior, se optó por el aislamiento viral (A.V.) como único estándar de oro para el análisis de resultados. Según esto y para el propósito de gold estándar, los resultados del A.V. serán considerados de la siguiente forma:

- **Suero con aislamiento viral positivo:** fueron considerados como los casos positivos de dengue, ya que se comprobó directamente la presencia del virus en la muestra.
- **Suero con aislamiento viral negativo:** fueron considerados como muestras sin dengue o negativos para dengue.

4.8. MÉTODOS DE LABORATORIO

4.8.1. Serología

Todas las muestras remitidas al LDSP, fueron procesadas por el personal de esa institución para la detección de anticuerpos IgM, en un ensayo de ELISA de captura usando el Kit UM-ELISA. En esta prueba los anticuerpos son capturados en microplacas cubiertas con un anticuerpo anti-IgM y luego se ponen en contacto con un antígeno de los cuatro serotipos de virus dengue. Si los anticuerpos están presentes en la muestra el antígeno es capturado y el complejo es detectado usando un anticuerpo anti-dengue marcado con una peroxidasa. La aparición de color como resultado de una acción enzimática indica una reacción positiva, determinada automáticamente de acuerdo a las indicaciones del ensayo. Un resultado fue considerado positivo cuando el valor de la desviación óptica (D.O.) fue mayor a 0.300 U. (UMELISA, Centro de Inmunoensayo del Instituto Pedro Kourí, La Habana,

Cuba). Solamente se ensayaba una vez la única muestra de suero tomada de cada paciente.

4.8.2. Cultivos celulares.

La línea celular C6/36- HT, clon de *Aedes albopictus* (SINGH & PAUL, 1969; Tesh, 1979; Kuno *et al.*, 1985) fue utilizada para la propagación y aislamiento del virus. El cultivo de esta línea requiere: medio de crecimiento base L-15 + 1% de antibiótico, triptosa 10%, PBS (pH 7.5) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). El medio de mantenimiento fue el mismo pero suplementado sólo con 2% de SFB (IPK, 1997). Brevemente, se descarta el sobrenadante de la caja (FALCON 25 cm²) lavando los residuos con 1X PBS para agregar 1 ml de medio L-15 y resuspender las células mediante un *scraper*. 1 ml de células en suspensión fue útil para preparar 40 ml de células, es decir 40 tubos (IPK, 1997).

4.8.3. Replicación de cepas y virus de referencia.

Cuadro 2. Cepas de referencia utilizadas en el estudio.

Serotipo	Cepa tipo
Serotipo 1 (DEN 1):	Cepa Colombiana aislada antes de 1998.
Serotipo 2 (DEN 2):	Cepa Colombiana aislada antes de 1998.
Serotipo 3 (DEN 3):	Cepa H-87.
Serotipo 4 (DEN 4):	Cepa H-241.

El cuadro 2 muestra las cepas de referencia del virus del dengue utilizadas en el presente estudio:

Las cepas de DEN 1 y DEN 2, fueron gentilmente donadas por el Doctor Jorge Boschel del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (I.N.S.) Bogotá, Colombia y las cepas de DEN 3 y DEN 4 por el Doctor Benedito Fonseca de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Estas cepas se replicaron en cultivos de células C6/36-HT, siguiendo la metodología usada de rutina en el Laboratorio de Virología del CINTROP (Kuno *et al.*, 1985; IPK, 1997). Para ello, las monocapas se infectaron con 20 μ l de sobrenadante sin diluir y se incubaron a 37 °C durante 1 h. La presencia del virus fue determinada por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como se describe adelante. Los sobrenadantes de cultivos positivos fueron alicuotados y almacenados a -70 °C antes de su uso.

4.8.4. Aislamiento primario de virus dengue.

El aislamiento del virus se realizó infectando monocapas de células C6/36-HT de tres días de crecimiento, contenidas en tubos de tapa rosca, con muestras de suero (Previamente sembradas). Para esto se obtuvo una dilución del suero en proporción 1:5 en PBS y luego de vaciar el medio de cada tubo se agregaron 100 μ l de esta dilución a cada uno. Se dejaba incubar a 37 °C por 60 min y luego se agregaba 1 ml de medio L-15 al 2%.

Luego de mantenerse a 34 °C por una semana, los tubos eran supervisados a diario al microscopio invertido por la aparición de efecto citopático (IPK, 1997).

La infección viral de las monocapas se verificaba por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) independientemente de la aparición de efecto citopático, usando anticuerpos monoclonales de cada serotipo (Kubersky & Rosen, 1977). Brevemente, las células tomadas del cultivo fueron resuspendidas en PBS estéril y se colocaba una gota de dicha suspensión en láminas de vidrio para Inmunofluorescencia. Éstas fueron incubadas a 37 °C para secar la preparación y después sumergidas en acetona fría por 15 min para fijación. Posteriormente, se adicionaban 15 µl del antisuero policlonal a cada pozo e incubando las láminas por 30 min a 37 °C. Enseguida fueron lavadas por 10 min en PBS (pH 7.5) y secadas a temperatura ambiente. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó al adicionar 15 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína (SIGMA Chemical, co.) previamente diluido en proporción 1:25 en tampón PBS/azul de Evans (1:3000). Las láminas fueron nuevamente incubadas a 37 °C por 30 min y luego lavadas por 10 min en PBS, secadas al aire y montadas para observación al microscopio. El serotipo del virus aislado fue confirmado usando anticuerpos monoclonales específicos para cada serotipo viral. (Donados por el Dr. Vordam, CDC, Puerto Rico) (IPK, 1997).

4.8.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR):

Todos los reactivos utilizados en esta sección fueron preparados con agua tratada con DEPC (Dietilpolicarbonato), para eliminar RNAasas y otras impurezas que pudieran afectar la calidad de la reacción. Brevemente, se agrega 1 µl de DEPC por cada litro de agua, se agita y se deja reposar 24 h. Antes de ser utilizada, el agua con DEPC, debe ser autoclavada por 15 min.

4.8.5.1. Extracción del RNA viral. El RNA viral se extrajo mediante el método de Isotiocianato de Guanidina–Fenol/Cloroformo, según las indicaciones y modificaciones hechas por Harris *et al.*, 1998 a partir del originalmente descrito por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). El RNA se extrajo combinando 300 µl de la muestra junto con 300µl de buffer de lisis (6M isotiocianato de guanidina, 50mM citrato de sodio, 1% sarkosyl, 100mM β-mercaptoetanol), 60 µl de 2M acetato de sodio (pH 4.0), 600 µl de fenol saturado en agua y 240 µl de cloroformo. Una vez mezclados los componentes por inversión, éstos se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 15 min. Después de trasladar la fase acuosa a un nuevo tubo y agregar igual volumen de isopropanol, las muestras se incubaron a –70 °C durante 30 min. Posteriormente fueron centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C por 15 min. Luego de descartar el sobrenadante se lavó el precipitado (pellet) con 200 µl de etanol 75% y los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm a 4

°C por 15 min. Los tubos se dejaban secar con la tapa abierta a temperatura ambiente y finalmente el RNA era resuspendido en 22 µl de agua y almacenado a -20 °C.

4.8.5.2. Amplificación del RNA viral. Se utilizaron los *primers* descritos por Lanciotti *et al.*, (1992), posteriormente modificados por Harris *et al.*, (1998), que amplifican una región común en los 4 serotipos y una específica de cada serotipo, ubicadas en los genes de las proteínas C y prM (Figura 8). Los *primers* fueron encargados a *Integrated DNA Technologies, IDT*. La región dentro del genoma que amplifican los *primers* es mostrada en la figura 8. Las secuencias de los *primers* así como los tamaños esperados de los productos de amplificación son descritos en la Tabla 1:



Figura 8. Organización del genoma del virus del dengue. La región amplificada por los *primers* de Lanciotti *et al.*, se señala en gris. Adaptado de Raengsakulrach *et al.*, 2002

Tabla. 1 Secuencias de nucleótidos de los *primers* de Harris *et al.*, 1998

PRIMER	SECUENCIA	Cadena	SEROTIPO DETECTADO	pb
D1	5' - TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G - 3'	-	1,2,3,4	511
D2	5' -TTG CAC CAA ACA GTC AAT GTC TTC AGG TTC - 3'	+	1,2,3,4	511
TS1	5' - CGT CTC AGT GAT CCG GGG G - 3'	+	1	482

TS2	5' - CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG - 3'	+	2	119
TS3	5' - TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C - 3'	+	3	290
DEN4	5' - TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC - 3'	+	4	389

El uso de un *primer* 5' (D1) complementario a una secuencia conservada en los 4 serotipos del virus dengue, en combinación con 4 *primers* 3' (TS1, TS2, TS3, DEN4) que hibridizan a secuencias específicas en el genoma de cada uno de los serotipos, permite la detección simultánea de los 4 serotipos del virus. Si lo que se quiere es sólo detectar la presencia del virus en la muestra, basta con el uso de los *primers* D1 y D2. Los sitios de los *primers* están diseñados para generar productos de diferentes tamaños para cada serotipo, lo cual permite distinguirlos fácilmente por medio de electroforesis (Tabla 1). Fueron incluidos controles negativos, positivos y también se acondicionaron controles de inhibición, de extracción y de reacción.

La calidad de los *primers*, fue determinada siguiendo el protocolo de una enzima (single-enzyme (rTth) RT-PCR), descrito por Harris *et al.*, (1998), procesando las siguientes muestras:

- Sobrenadantes de cultivos inoculados con virus dengue, serotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 de diferentes cepas, así como sueros de pacientes de quienes el virus fue aislado.
- Controles negativos: Sobrenadantes y pellets de cultivos celulares no inoculados con virus, sueros de individuos sanos, controles de reactivos y

del agua.

Como una forma de evitar la contaminación de las muestras y los reactivos, se implementaron tres estrategias: una fue la de la separación física de las etapas individuales del proceso en: área de preparación de mix “cuarto blanco”, área pre-PCR “cuarto gris” y área PCR “cuarto negro”. Otra estrategia fue la de utilizar luz UV y alcohol para descontaminar las superficies de las áreas de trabajo. Por último, de cada reactivo utilizado se distribuyeron alícuotas en tubos de 0.5 ml debidamente etiquetados, para evitar problemas de contaminación y/o deterioro de los mismos (Dieffenbach & Dvskler, 1995).

Se utilizó como área de preparación de mix o “cuarto blanco” la cámara de flujo laminar, que hasta entonces había sido utilizada única y exclusivamente en la propagación de la línea celular C6/36 HT y posteriormente en la preparación de los stock y alícuotas de algunos reactivos. El área pre-PCR o “cuarto gris” asignada, estaba separada del cuarto blanco y de hecho quedaba en otra locación dentro de las instalaciones del CINTROP. El área PCR o “cuarto negro” corresponde a la habitación en la que se encuentra ubicado el termociclador (Ref. *Minicycler® Peltier Thermo Cyclers*) y también constituye una locación completamente separada de las otras dos.

Se utilizaron los protocolos de amplificación con una y dos enzimas

propuestos por Harris *et al.*, (1998). En estos protocolos, los procesos de transcripción reversa del RNA del virus de dengue y amplificación del ADN complementario resultante son combinados y llevados a cabo en un mismo tubo.

Los siguientes son los protocolos RT-PCR evaluados en este trabajo:

- Protocolo 1: RT-PCR multiprimer de una enzima (Enzima: *rTth* Polimerasa de ADN; *Primers*: D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4).
- Protocolo 2a, Primera ronda: RT-PCR universal, (Enzima: AMV Transcriptasa Reversa - Amplitaq Gold DNA polimerasa; *Primers*: D1, D2).
- Protocolo 2b, Segunda ronda: PCR anidada, (Amplitaq Gold DNA polimerasa; *Primers*: D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4).

4.8.5.3. Interpretación de los resultados RT-PCR. Una muestra positiva es aquella donde se logra amplificar un fragmento de ADN con el tamaño esperado. Un caso positivo por RT- PCR de Dengue es un caso confirmado de Dengue. Los productos de amplificación fueron observados por electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida. La detección de fragmentos de 482, 119, 290 y 389 pares de bases (pb), para cada uno de los cuatro serotipos respectivamente DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4, o de

511 pb en el caso de amplificaciones con los *primers* universales, era indicativo de un resultado positivo para la prueba.

A continuación se presenta el procedimiento guía utilizado como base para la realización de todos los ensayos RT-PCR y posteriormente se presentan cada uno de los protocolos ensayados:

4.8.5.4. Procedimiento guía de amplificación RT-PCR

Este procedimiento se resume a continuación en el cuadro 3:

Cuadro 3. Procedimiento guía de amplificación por RT-PCR.

<p>Nota : Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo. Las gradillas deben estar inmersas en hielo.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Calcular la cantidad necesaria de los mix de <i>primers</i> y de reacción para el número deseado de muestras, de acuerdo a los stock preparados2. Llenar el formato de ensayo de amplificación antes de iniciar el procedimiento.
<p><i>En el área de preparación de mix “cuarto blanco”:</i></p> <ol style="list-style-type: none">1. Marcar los tubos de reacción (0.2 ml) de cada muestra y los de preparación de mix y <i>primers</i> (0.5 ml).2. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con golpes firmes en la parte inferior del tubo cerrado.3. Utilizando micropipetas propias del área, preparar la mezcla de reacción y de <i>primers</i> en tubos de 0.5 ml.4. Homogenizar las mezclas por suave aspiración con micropipeta, teniendo cuidado de no producir burbujas.5. Agregar el volumen indicado de estas dos mezclas a cada tubo de reacción (Tabla).

6. Mezclar cada tubo de reacción por suave aspiración con micropipeta, teniendo cuidado de no producir burbujas.
7. Agregar la enzima a cada tubo de reacción y mezclar suavemente como en el paso anterior y nuevamente teniendo cuidado de no producir burbujas.
8. Agregar agua DEPC al tubo que servirá como control de reacción.
9. Transferir rápidamente los tubos de reacción de la gradilla del área de preparación a la correspondiente gradilla del área pre-PCR.
10. Regresar al refrigerador las alícuotas de todas las muestras.

En el área pre-PCR “cuarto gris”:

11. Adicionar 10 μ l de cada RNA de interés en su correspondiente tubo de reacción.
12. Agregar 1 gota de aceite mineral estéril en cada tubo de reacción.
13. Llevar la gradilla con los tubos al cuarto de reacción.

Nota : Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo. Las gradillas deben estar inmersas en hielo.

Área PCR “cuarto negro”:

14. Ubicar los tubos de reacción en el termociclador y activar el programa de ciclaje.

Nota: Fuera del cuarto negro y mientras corre el programa de ciclaje, preparar el gel de agarosa.

15. Una vez terminado el programa de ciclaje, retirar los tubos y ubicar en una gradilla según el orden estipulado en el formato.
16. En un trozo grande de parafilm, preparar las muestras para el gel en el orden estipulado en la guía, con: 20 μ l del producto y 3 μ l de colorante.
17. Adicionar las muestras en el gel según el orden predeterminado.
18. Agregar el marcador de peso molecular en el pozo asignado del gel.
19. Correr el gel durante 1 hora a 100 voltios.

20. Tomar registro de los resultados (en el formato de ensayo de RT-PCR para dengue y/o fotográfico).

4.8.5.5. Protocolo 1: RT-PCR multiprimer. Este protocolo se desarrolló utilizando la enzima: *rTth* Polimerasa de ADN y los primer: D1, TS1, TS2, TS3 y DEN4, para amplificar fragmentos correspondientes a cada uno de los serotipos virales en el cuadro 4 se presenta el resumen de este protocolo.

Cuadro 4. Resumen del protocolo de amplificación RT-PCR multiprimer con la enzima *rTth*.

Volumen de final reacción: 50 µl (completado con H2O-DEPC).

Mezcla de reacción	Concentración
• Acetato de potasio	115 mM
• Glicerol	8%
• Bicina	50 mM (pH 8.2)
• dNTPs	200 µM c/u
• Acetato de Manganeso	2 mM
• Primer D1 y TS1	0.5 µM
• Primer TS2, TS3 y DEN4	0.25 µM
• <i>rTth</i> Polimerasa de ADN (Perkin-Elmer Corp; Calif.)	0.05 U/µl

Muestra (RNA extraído)	Vol. Total: 10µl
------------------------	------------------

Tiempos de Reacción (Programación del termociclador)

Un ciclo de 60 °C por 30 min para la Transcripción Reversa.
Un ciclo de incubación a 94 °C por dos min.
40 ciclos de amplificación constituidos por ciclos de:
• 94 °C por 45 s

• 50 °C por 1min
• 60 °C por 1 min
Un ciclo de extensión final a 60 °C por 7 min

4.8.5.6. Protocolo 2a, Primera ronda: RT-PCR universal. En este protocolo se utilizan las enzimas AMV Transcriptasa Reversa y Amplitaq Gold DNA polimerasa, con los *primers* D1 y D2, para detectar un fragmento de 511 pb común a los cuatro serotipos virales (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resumen del protocolo de amplificación RT-PCR universal Primera ronda con las enzimas AMV Transcriptasa Reversa y Amplitaq Gold DNA polimerasa

Volumen de reacción final: 50 µl (completado con H2O-DEPC).

Mezcla de reacción	Concentración
• Cloruro de Potasio	50 mM
• Tris (pH: 8.5)	10 mM
• Triton X-100	0.1 %
• Gelatina	0.01%
• dNTPs	200 µM c/u
• Cloruro de Magnesio	1.5 mM
• Cloruro de tetrametilamonio	30 mM
• Betaína	0.5 M
• Ditioneitol	5mM
• Primer D1 y D2	1 µM
• AMV Transcriptasa Reversa	0.1 U/µl
• Amplitaq Gold DNA polimerasa	0.025 U/µl
• Muestra (RNA extraído)	Vol. Total: 10µl

Tiempos de Reacción Primera ronda (Programación del termociclador)

Un ciclo de 42 °C por 60 min para la Transcripción Reversa
42 ciclos de amplificación constituidos por ciclos de:
• 94 °C por 30 s (Desnaturalización)
• 55 °C por 1 min (Alineamiento)
• 72 °C por 1 min (Extensión)
Un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min

4.8.5.7. Protocolo 2b, Segunda ronda: PCR anidada. En este protocolo se utiliza la enzima Amplitaq Gold DNA polimerasa. Se inicia con 10 µl del producto de la ronda de amplificación universal. La mezcla usada para esta segunda reacción contenía todos los reactivos usados en la RT-PCR universal, con las siguientes excepciones: se reemplazó el *primer* D2 con los *primers* TS1, TS2, TS3, y DEN4 (Tabla 1) para los serotipos virales específicos y se eliminaron el ditiotreitol y la Transcriptasa Reversa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resumen de la segunda ronda de amplificación del protocolo RT-PCR universal con la enzima Amplitaq Gold DNA polimerasa

Tiempos de Reacción (Programación del termociclador)

SEGUNDA RONDA
42 ciclos de amplificación constituidos por ciclos de:
• 94 °C por 30 s (Desnaturalización)
• 55 °C por 1min (Alineamiento)
• 72 °C por 1 min (Extensión)
Un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min

4.8.6. ELECTROFORESIS

4.8.6.1. Gel de Agarosa. La visualización de los productos de la amplificación se realizó por electroforesis en gel 1.5% de agarosa y buffer 1X TBE (89mM Tris Borato, 2 mM EDTA (pH 8.3)). A cada pozo del gel se agregaron 15 μ l del producto de amplificación mezclado con 2 μ l de buffer de carga con Azul de Bromofenol, (Sambrook *et al.*, 1989). En las electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular de 100 – 1500 pb ó de 75 – 676 pb. Fueron realizadas a un voltaje constante de 100 V por 1:30 horas. Luego el gel fue teñido en solución 1 μ g/ml bromuro de etidio durante 10 min y lavado en agua por otros 10 min para retirar los excesos del colorante. Finalmente la visualización del ADN se hizo efectiva mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Fotografías de algunos geles de agarosa fueron tomadas en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, UIS, con cámara Polaroid Hamlin 57135-000, utilizando películas ISO 3000/36°-667.

4.8.6.2. Gel de Poliacrilamida. Para esto, se preparó una solución de trabajo mezclando 5 ml 1x TBE y 1.2 ml de acrilamida a la cual se le adicionaron simultáneamente 39 μ l de persulfato de amonio 10% y 7 μ l de TEMED. Esta se agregó directamente en la cámara de electroforesis vertical y se colocó el peine, dejando polimerizar el gel por 30 min. Luego de quitar el peine se adicionó 1x TBE en la parte superior como inferior de la cámara. Se sembró y se corrió a 60 V durante 1:30 horas. Brevemente, la coloración del

gel se efectuó de la siguiente forma: el gel se colocó en la solución fijadora (25 ml de etanol, 150 ml de agua y 2 ml de ácido acético) por cinco min. Luego se retiró de la solución fijadora y se adicionó la solución de plata (25 ml de solución fijadora, 0.17 gr. de AgNO_3 y 50 ml de agua) por 10 min. Se lavó rápidamente con agua y se adicionó la solución reveladora (4.5 gr. NaOH, 150 ml de agua y 1 ml de formaldehído) hasta que aparecieron las bandas. Para guardar el gel, se pasó nuevamente a la solución fijadora y se cubrió con papel celofán frío. Imágenes de algunos geles de poliacrilamida fueron obtenidas mediante el uso de un escáner.

4.9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se elaboró una base de datos en Excel 2000 que en general contenía datos del paciente, datos de la muestra, resultados de pruebas de Elisa, de aislamiento viral y de RT-PCR. Cada uno de los ensayos practicados se registró en la base de datos como una nueva una nueva entrada. Para evitar confusiones, a los ensayos practicados por RT-PCR se le asignó un número consecutivo comenzando desde 1. En el cuadro siete, se enuncia la información que contenía la base de datos:

Cuadro 7. Información contenida en la base de datos.

Protocolo utilizado:	Si se trata de los protocolos con una o dos enzimas.
Tipo de muestra:	Si la muestra en cuestión era suero o sobrenadante

Código del Suero:	Número de identificación del suero asignado en el laboratorio.
Aislamiento viral:	Decir si el resultado del A.V. fue positivo o negativo.
Serotipo:	El número correspondiente al serotipo aislado. Si el A.V. fue negativo o no determinado, se asignó el número 0.
Método de extracción:	Nombre del protocolo de extracción del RNA viral ensayado: GuSCN-Fenol/Cloroformo.
Tipo Ensayo:	Multiprimer, universal o nested.
Resultado de RT-PCR:	Se indica el resultado del ensayo: positivo o negativo.
Día de toma de muestra:	Indica el número de días transcurridos desde el inicio de los síntomas hasta que se tomó la muestra enviada al LDSP.
IgM:	Resultado del ensayo de ELISA. Se indica el dato de la Densidad óptica.
Dx. Serológico:	Interpretación diagnóstica aproximada, del resultado del ensayo de ELISA IgM, teniendo en cuenta el día de toma de muestra.
Edad:	Edad del paciente.
Forma Clínica:	Severidad del caso. Si se trata de DC o DH.
Días de Almacenamiento:	Tiempo en días que la muestra permaneció almacenada desde que fue tomada hasta que se le practicó el ensayo de A.V.
Caso Fatal:	Si la muestra procede de una fatalidad sospechosa de dengue.

Los resultados fueron presentados en tablas 2 x 2 como la que se muestra en la tabla 2, (Kraemer, 1992; SHEPS & SCHECHTER, 1984):

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, en cada prueba se calculó (Cuadro 8): (Kraemer, 1992; OROZCO & CAMARGO, 1997; SHEPS & SCHECHTER, 1984):

Tabla 2. Tabla 2x2 para la presentación de resultados.

		GOLD STANDARD (Aislamiento viral)		
PRUEBA (RT-PCR)	Resultado	+	-	Total
	+	VP	FP	Q
	-	FN	VN	Q'
	Total	P	P'	N

Cuadro 8. Descriptores calculados a partir de los resultados obtenidos.

Cálculo realizado	Sigla
Prevalencia	(P)
Nivel de la prueba	(Q)
Sensibilidad	(S)
Especificidad	(E)
Índices de calidad	k(1,0) y k(0,0)
Verdaderos Positivos	(VP)
Verdaderos negativos	(VN)
Falsos Positivos	(FP)
Falsos Negativos	(FN)
Eficiencia	(EF)
Valor Predictivo Positivo	(VPP)
Valor Predictivo Negativo	(VPN)

5. RESULTADOS

Un total de 483 muestras de suero cumplieron con los criterios de elección del estudio por ser casos con diagnóstico clínico de dengue clásico o hemorrágico, con prueba de anticuerpos IgM y ensayo de aislamiento viral (Tabla 3). El Anexo 1 presenta la base de datos con la totalidad de los ensayos desarrollados con las diferentes muestras y protocolos de amplificación. Los sueros incluidos en el estudio distribuidos por año de ingreso se presentan a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Muestras incluidas en el estudio distribuidos por año de ingreso.

Año	Total de sueros	Sueros A.V. positivo	Cepas incluidas en el estudio
1998	107	11	7
1999	66	3	1
2000	85	7	6
2001	177	15	11
2002	48	6	11
Total	483	46	36

De las 483 muestras, 437 presentaron ensayo de aislamiento viral negativo

(AV-) y 46 tuvieron ensayo de aislamiento viral positivo (AV+). Esto nos indica una prevalencia del 9.7%. De las 46 muestras con A.V. positivo, 10 (22%) no tenían el volumen de suero suficiente para realizar RT-PCR. Por este motivo, sólo fueron utilizadas en el estudio 36 muestras con aislamiento viral positivo. Sin embargo y por esta misma razón, sólo 19 de estos sueros fueron ensayados con los dos protocolos. También fueron ensayados 60 sueros con aislamiento viral negativo. Los mismos sueros ensayados por el protocolo 1 (16 sueros) fueron también probados con el protocolo 2 que sumo un total de 60 sueros ensayados. Los resultados de los ensayos realizados en la segunda ronda de amplificación del Protocolo 2 o protocolo 2b (nested), confirmaron los obtenidos con la primera ronda o protocolo 2a (universal) (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de sueros utilizados con los dos protocolos RT-PCR estudiados en este trabajo.

36 SUEROS CON AV +		60 SUEROS CON AV -	
Protocolo 1	26	Protocolo 1	16
Protocolo 2	25	Protocolo 2	60
Ensayados con los dos protocolos	19	Ensayados con los dos protocolos	16

Más información de los sueros con aislamiento viral positivo y negativo y de los ensayos RT-PCR practicados se encontrará en el Anexo 2.

La Tabla 5 muestra un resumen de los resultados obtenidos con los dos

protocolos ensayados, discriminándolos por serotipos virales. También incluye los ensayos realizados a partir de sueros con AV -.

Tabla 5. Resultados obtenidos con los protocolos RT-PCR ensayados en muestras de suero, discriminados por serotipo viral. Serotipo 0 equivale a los aislamientos virales negativos.

Tipo Ensayo	Serotipo	Resultado RT-PCR		
		Neg	Pos	Total ensayos
Protocolo 1	0	20	0	20
	DEN-1	4	1	5
	DEN-2	5	3	8
	DEN-3	3	5	8
	DEN-4	5	0	5
Total Multiprimer		37	9	46
Protocolo 2	0	82	1	83
	DEN-1	1	1	2
	DEN-2	4	4	8
	DEN-3	3	9	12
	DEN-4	3	0	3
Total Nested		93	15	108
Total general		130	24	154

La calidad de los *primers* se evaluó mediante la amplificación exitosa de las cuatro cepas de referencia y de 10 cepas de previos aislamientos virales positivos. Sin embargo, se detectó la presencia de dos diferentes productos RT-PCR en la amplificación del serotipo DEN-2: la banda de tamaño esperado (119 pb) y un segundo producto desconocido con un tamaño aproximado de 143 pb. Esta banda desconocida se presentó en todos los ensayos con este serotipo y se asumió como un producto RT-PCR inespecífico (Figura 9).

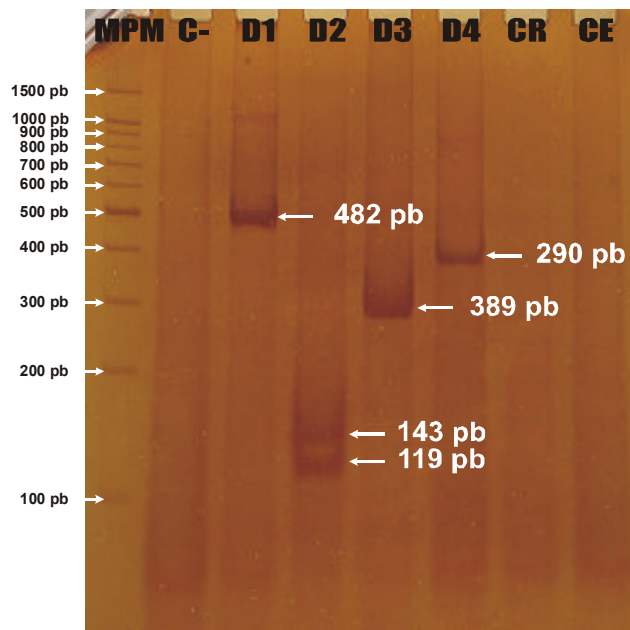


Figura 9. Gel de poliacrilamida mostrando los productos RT-PCR de los cuatro serotipos virales extraídos de sobrenadantes de referencia. MPM: Marcador de peso molecular C-: Control negativo, D1: DEN-1, D2: DEN-2, D3: DEN-3, D4: DEN-4, CR: Control de Reacción, CE: Control de extracción.

Los respectivos tamaños de los dos fragmentos DEN-2 se determinaron mediante una curva control. Para esto, se midió la distancia alcanzada por cada banda del marcador de peso molecular y por el producto PCR de interés (en un mismo gel). Luego se graficó la distancia de migración alcanzada en el gel vs. del logaritmo del tamaño de los fragmentos (Tabla 6). Finalmente, los fragmentos de interés son ubicados en la curva, según la distancia recorrida (eje X), obteniéndose un valor logarítmico (eje Y). El antilogaritmo equivale al tamaño del fragmento (Figura 10). De esta forma, se pudo comprobar la presencia del producto DEN-2 específico (119 pb) y determinar el tamaño del producto inespecífico en 143 pb (Figura 10).

Tabla 6. Datos utilizados en la elaboración de la curva control (en negro). En rojo se aprecian los datos obtenidos para los dos fragmentos DEN-2.

bp	Distancia recorrida en mm.	Log. bp
1500	7.4	3.2
1000	10.7	3.0
900	11.7	3.0
800	13.0	2.9
700	14.7	2.8
600	16.9	2.8
500	19.6	2.7
400	23.5	2.6
300	28.8	2.5
200	36.1	2.3
143	42.2	2.2
119	45.7	2.1
100	49.0	2.0

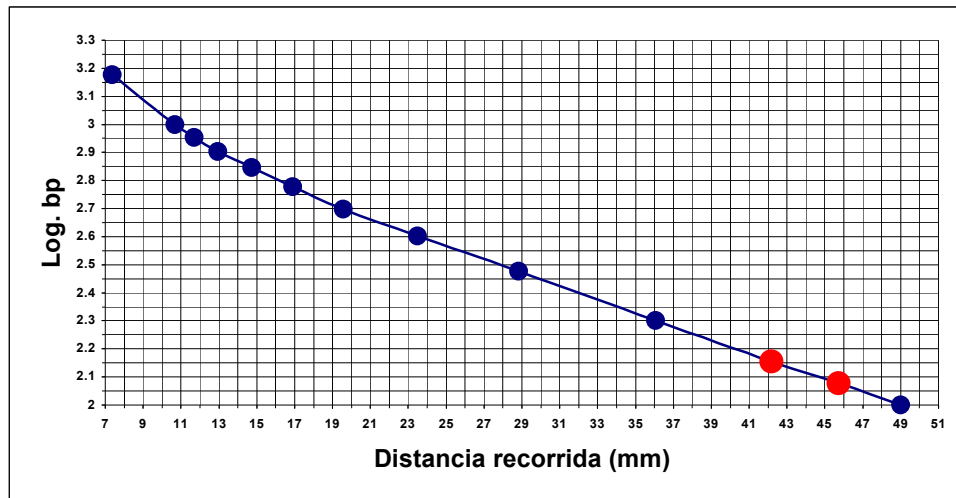


Figura 10. Curva control con los dos fragmentos amplificados por los primers D1 y TS2: Los respectivos tamaños en pares de bases son: 143 y 119 pb (rojo). Los puntos azules corresponden a las bandas de referencia del marcador de peso molecular.

Se evaluaron dos protocolos de amplificación del RNA del virus Dengue según se había descrito anteriormente, (pág. 73).

En todos los resultados RT-PCR positivos, hubo acuerdo entre el serotipo

amplificado y el detectado inicialmente por aislamiento viral e Inmunofluorescencia Indirecta.

No se detectó producto de amplificación para sueros DEN-4 ni para sus respectivas cepas aisladas por ninguno de los protocolos ensayados (Figura 11).

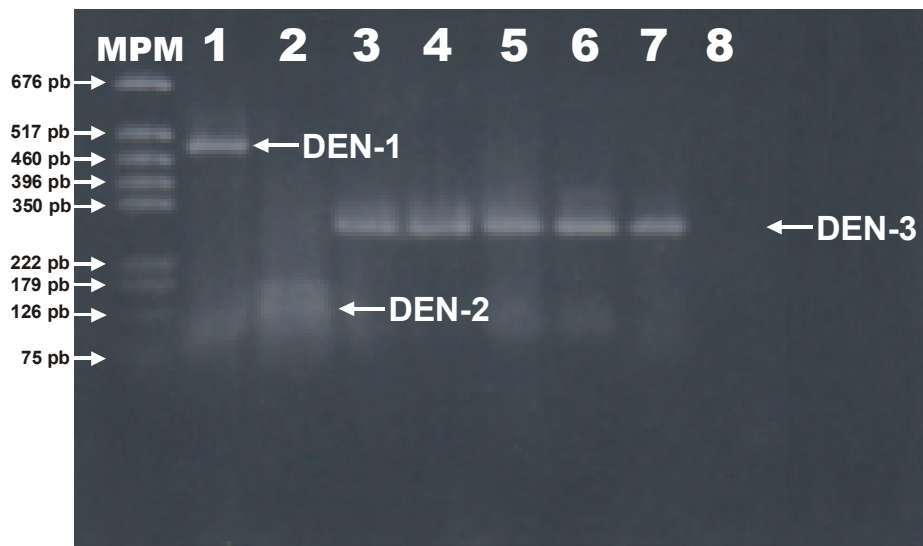


Figura 11. Productos RT-PCR de los tres serotipos virales extraídos de sueros de pacientes. MPM: Marcador de peso molecular, 2: DEN-1, 3: DEN-2; 4 al 7: DEN-3, 8: Control de reacción.

Resultados del ensayo RT-PCR multiprimer de una enzima (*rTth* Polimerasa de ADN), Protocolo 1.

La sensibilidad de este protocolo fue de 34.6% y su especificidad de 100%.

Los respectivos índices de calidad fueron 32.4% y 100%. La concordancia de

ensayo en términos de la eficiencia fue del 59.5%. El valor predictivo positivo fue de 100% y el valor predictivo negativo de 93.6% (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de los resultados RT-PCR obtenidos con el protocolo 1.

Protocolo 1 (RT-PCR rTth Multiprimer)		GOLD STANDARD (Aislamiento viral)				
Sensibilidad	0.346	PRUEBA (RT-PCR rTth multiprimer)	Resultado	+	-	Total
Especificidad	1.000		+	9	0	9
k(1,0)	0.324		-	17	16	33
k(0,0)	1.000		Total	26	16	42
VP	0.033		No		483	
VN	0.905		Dx+		46	
FP	0.000		Prevalencia (P)		0.095	
FN	0.062		P'		0.905	
Eficiencia	0.595		Nivel de la prueba (Q)		0.033	
VPP	1.000	Q'		0.967		
VPN	0.936					
VP'	15.923					
VN'	437					
FP'	0					
FN'	30.077					

Respecto a las 9 muestras con diagnóstico y prueba positiva, todas fueron colectadas dentro de los 4 primeros días de síntomas y entre éstas 6 presentaron hasta 4 días de almacenamiento. De las 17 muestras RT-PCR negativas sólo 10 presentan dato del tiempo de almacenamiento. Entre estas muestras, 5 presentaron 5 días o más de almacenamiento y las 5 restantes presentaron hasta 4 días de almacenamiento.

Este protocolo alcanzó bajas respuestas de detección de virus que van desde el 20% para los serotipos del virus DEN-1 hasta el 62.5% para el serotipo DEN- 3 ensayados. El serotipo DEN-4, no fue detectado (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de los serotipos amplificados con el protocolo 1.

Protocolo 1: RT-PCR rTth multiprimer			
Serotipo	A.V. +	RT-PCR +	% sensibilidad
Dengue 1	5	1	20
Dengue 2	8	3	37.5
Dengue 3	8	5	62.5
Dengue 4	5	0	0
Total	26	9	34.61

Se comprobó también la utilidad de este protocolo para amplificar infecciones múltiples en sobrenadantes, por la amplificación simultánea de cantidades iguales de los serotipos DEN-1 y DEN-3, DEN-2 y DEN-4, DEN-1 y DEN-4, DEN-3 y DEN-4 (datos no mostrados). Otras combinaciones no fueron ensayadas.

Resultados del ensayo RT-PCR universal y PCR anidada (Protocolo 2 - primera y segunda ronda).

Todos los resultados obtenidos con la PCR anidada fueron consistentes con los previamente obtenidos con la RT-PCR Universal. Ver Anexo 2

Tabla 9. Resumen de los resultados RT-PCR obtenidos con el protocolo 2.

Protocolo 2 (AMV-Taq Nested)		GOLD STANDARD (Aislamiento viral)				
Sensibilidad	0.560	PRUEBA (RT-PCR rTth multiprimer)	Resultado	+	-	Total
Especificidad	1.000		+	14	0	14
k(1,0)	0.535		-	11	60	71
k(0,0)	1.000		Total	25	60	85
VP	0.053		No	483		
VN	0.905		Dx+	46		
FP	0.000		Prevalencia (P)	0.095		
FN	0.042		P'	0.905		
Eficiencia	0.871		Nivel de la prueba (Q)	0.053		
VPP	1.000		Q'	0.947		
VPN	0.956					
VP'	25.760					
VN'	437					
FP'	0					
FN'	20.240					

La sensibilidad de este protocolo fue del 56% y su especificidad de 100%. Los respectivos índices de calidad fueron 53.5% y 100%. La concordancia de ensayo en términos de la eficiencia fue del 87.1%. El valor predictivo positivo fue de 100% y el valor predictivo negativo de 95.6% (Tabla 9).

Entre las 14 muestras con diagnóstico y ensayo RT-PCR positivo, 11 (78%) fueron colectadas dentro de los 4 primeros días de síntomas.

Según el serotipo viral, este protocolo logró la amplificación del 50% de los virus DEN-1 y DEN-2 ensayados y 75% del serotipo DEN-3. El serotipo DEN-4, no fue detectado (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de los serotipos amplificados con el protocolo 2.

RT-PCR AMV-Taq Nested			
Serotipo	A.V. +	RT-PCR +	% sensibilidad
Dengue 1	2	1	50
Dengue 2	8	4	50
Dengue 3	12	9	75
Dengue 4	3	0	0
Total	25	14	56

Respecto al tiempo de almacenamiento de las muestras, de las 11 muestras RT-PCR negativas, sólo 8 presentan dicha información. Entre éstas, 6 estuvieron almacenadas por 6 o más días y las 2 restantes fueron colectadas en el día 5° de inicio de síntomas.

Cabe anotar que este protocolo amplificó por RT-PCR un suero del año 2000 proveniente de un caso fatal, que no había sido sometido al ensayo de aislamiento viral. Según el ensayo RT-PCR, se determinó que el serotipo viral de esta muestra fue DEN-2. La muestra había sido colectada el día 5° de síntomas y tenía 6 días de almacenamiento. Según su ensayo de anticuerpos IgM se había catalogado como caso inconcluso.

Frecuencia de casos confirmados por serología vs. detección mediante RT-PCR

Según la interpretación del ensayo ELISA-IgM realizada por el LDSP, del total de muestras captadas (483), aproximadamente 329 (68.11%) presentaron títulos detectables de anticuerpos IgM, por lo que estos casos serían reportados como positivos para dengue (probables) y los 154 restantes (31.88%) como casos negativos para dengue por no presentar anticuerpos detectables. Esta sería la interpretación resultante de muestras no pareadas, con lo que no son tenidos en cuenta los casos inconclusos.

Para determinar las frecuencias de casos de dengue confirmados por serología vs. detección mediante RT-PCR, en los casos reportados al sistema de vigilancia, se determinó la proporción de casos con prueba RT-PCR positiva respecto a la positividad del ensayo de IgM. El 56% del total de casos RT-PCR positivos, presentó ensayo de anticuerpos IgM negativo y el 44% restante presentó ensayo de anticuerpos IgM positivo.

Temporalidad y frecuencia de serotipos de virus dengue que circulan en el Departamento

Entre las provincias del departamento de Santander la más afectada es la de Soto, que aporta alrededor del 80% de los casos, la mayoría de estos pertenecientes a los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta seguidos por municipios de la Provincia Comunera. Los serotipos DEN-1 y DEN-2 circularon en el departamento de Santander durante los años 1998 y 1999. Durante el año 2003, circuló además el

serotipo DEN-4. En el curso de la epidemia del año 2001, se detectó el serotipo DEN-3 no detectado desde la década de los años 70 en el país (Figura 12). Finalmente, hasta mediados del año 2002 la vigilancia virológica había detectado la circulación de los serotipos DEN-2 y prevalentemente el serotipo DEN-3.

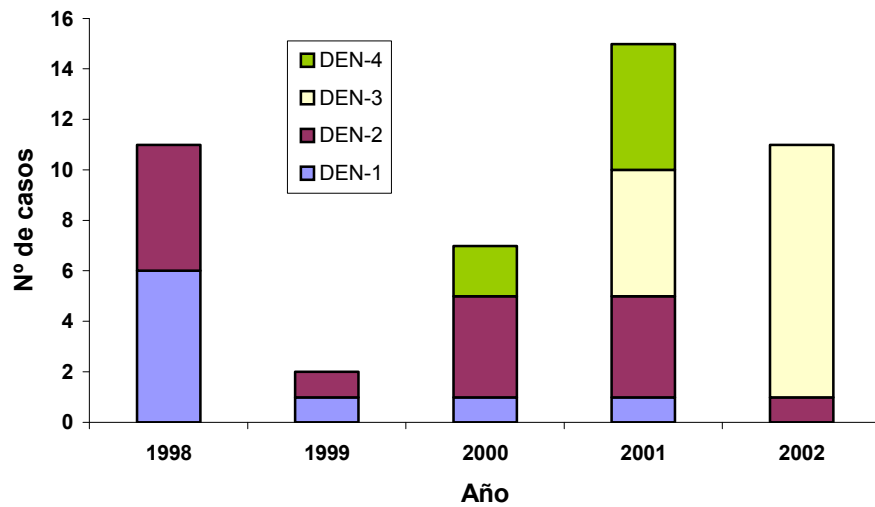


Figura 12. Distribución temporal de los serotipos dengue en el departamento de Santander

6. DISCUSIÓN

Un factor que limitó e incidió drásticamente en el desarrollo metodológico del estudio, fue el bajo volumen disponible de los sueros que impidió la utilización de un 22% de las muestras con aislamiento viral positivo, aparte de las muestras que solamente alcanzaron para un ensayo de amplificación. Esto se debe a que el sistema de vigilancia epidemiológica local se encuentra apoyado completamente en la serología, por lo cual se obvian ciertas necesidades y requerimientos particulares de otros sistemas de vigilancia como la virológica y la vigilancia molecular. Debe recordarse que un sistema de vigilancia debe ser flexible para posibilitar la incorporación de nueva información (OPS, 1994).

La vigilancia virológica es muy importante en el estudio epidemiológico del dengue (Gubler, 1989; OPS, 1994). Aunque esta forma de vigilancia está basada en pruebas relativamente poco rápidas y sensibles, en nuestra localidad el sistema de vigilancia virológica es además poco eficiente y viable y se restringe a la comunidad científica y académica.

En diferentes estudios forénos sobre vigilancia virológica y diagnóstico de laboratorio en sistemas regionales de vigilancia rutinaria, se han reportado tasas de aislamiento viral medianamente superiores a las presentadas en este trabajo (9.52%). En el estudio de Fujita *et al.*, 1997, la tasa de aislamiento viral en cultivo de células C6/36 fue de 17 cepas (17%) entre 98 sueros. En 1988, Nogueira *et al.*, obtuvieron una tasa de aislamiento viral con esta línea celular, de 52 cepas (31.5%) entre 165 sueros ensayados. ROSSI *et al.*, en 1998, reportaron tasas de aislamiento viral de 161 cepas (39%) entre 414 sueros. Fakeeh & Zaki en su estudio de 2001, reportaron 207 aislamientos (21%) de 985 sueros con esta misma línea celular.

Es de anotar que en estos estudios se inoculaban las monocapas inmediatamente después de haber colectado las muestras o dentro de las siguientes 24 horas de haber sido tomadas, caso en el cual eran conservadas en refrigeración. De hecho, uno de los aislamientos virales exitosos en el laboratorio (CINTROP), confirma la importancia de este requerimiento. Se trataba de una estudiante de bacteriología que hacía su práctica en el laboratorio, cuya muestra de suero se inoculó inmediatamente después de haber sido colectada, obteniéndose un aislamiento de virus DEN-4, ilustrando como la infección inmediata de monocapas celulares aumenta las posibilidades de aislamiento viral. De esta forma, se observa que las condiciones operativas de vigilancia en las que se desarrollaron estos trabajos son muy diferentes a las que presenta el sistema de vigilancia regional.

En nuestra localidad, el ensayo se hace días y hasta semanas después de haber obtenido las muestras y probablemente las condiciones de almacenamiento de las mismas son ineficientes o inadecuadas al menos para los programas de vigilancia virológica o molecular. De hecho el promedio de tiempo de almacenamiento de las muestras, es de 25 días y puede aumentar hasta en dos meses dependiendo del suministro del kit de ELISA en el L.D.S.P. Además, muchas instituciones no cumplan con las recomendaciones de colecta, manejo y transporte de muestras destinadas al diagnóstico por detección directa del virus, propuestas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1997). Todo lo anterior influye significativamente en la temprana activación de las medidas de control y alerta del sistema de vigilancia de la enfermedad.

Sin embargo, no es fácil que dentro de un sistema de vigilancia apoyado en la serología, las muestras sean enviadas al Laboratorio dentro de las 24 horas siguientes a su colecta, o en su defecto almacenadas a -70°C para preservar la viabilidad del virus y mejorar la sensibilidad del ensayo de aislamiento (Gubler *et al.*, 1984; Vorndam & Kuno, 1997).

Estos requisitos de envío y almacenamiento son difíciles de cumplir por la carencia de funcionarios dedicados a la recolección de datos y muestras así como de su envío y/o transporte. También por la falta de equipos de refrigeración adecuados en las instituciones donde las mismas se colectan,

lo cual afecta la viabilidad del virus para el aislamiento viral. En Indonesia, donde por ley los casos de dengue deben ser reportados dentro de las siguientes 24 horas después de la admisión, se ha encontrado que tan solo el 31% de los casos es reportado a la oficina de salud encargada cumpliendo con este requisito (Chairulfatah *et al.*, 2001) y en un estudio de vigilancia serológica y virológica en Arabia Saudita Fakeeh & Zaki (2001) reportaron 15.4% de éxito en la colecta de muestras de sueros de fase convalescente de pacientes ya captados por el sistema de vigilancia incluidos en el estudio.

No obstante, la tasa de aislamiento viral debe ser analizada y mejorada, considerando la situación endémica de la región y las dificultades en la colecta de especímenes. Estudios recientes recomiendan la centrifugación de los tubos durante 30 min a 1500-2000 rpm, una vez la muestra ha sido inoculada sobre la monocapa celular, lo cual incrementa la frecuencia de aislamiento viral. Igualmente, la obtención del resultado del ensayo también puede agilizarse pues permite detectar hasta el 42% de positivos al segundo día de la infección (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

La RT-PCR ha sido de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones por diferentes virus RNA (Tang *et al.*, 1997). Para el virus del dengue, la RT-PCR provee un rápido diagnóstico identificando al mismo tiempo el serotipo de virus. Diferentes modalidades han sido adaptadas por varios autores, mostrando variaciones en su sensibilidad y especificidad (Deubel *et al.*, 1990; Guzmán & Kourí, 1996; Gubler, 1998; Lanciotti *et al.*, 1992; Harris *et al.*,

1998; Chow *et al.*, 1998). Sin embargo, la información presentada en estos artículos es deficiente en cuanto a la evaluación objetiva de dichos ensayos como prueba diagnóstica. En la mayoría de los casos, de los procedimientos RT-PCR para virus dengue publicados hasta el momento sólo se conoce la evaluación de sensibilidad y especificidad determinada por los laboratorios que los desarrollaron (Vorndam & Kuno, 1997).

En 1998, Rosario y su grupo de investigación mencionaron que a pesar de que el método de RT-PCR ideado por Lanciotti ha sido probado previamente en distintos lugares y momentos con distintas cepas de virus del dengue obtenidas de sueros virémicos y prototipos estándar, hacía falta evaluar más a fondo su utilidad, especificidad y sensibilidad para detectar e identificar los serotipos de virus del dengue presentes en muestras clínicas provenientes de los sistemas rutinarios de vigilancia epidemiológica.

En el presente estudio, el protocolo de amplificación del genoma del virus dengue que presenta mayor probabilidad de validez diagnóstica, fue el de amplificación con dos enzimas (AMV Transcriptasa reversa y Taq Gold Polimerasa) y primers universales (D1-D2). Los resultados de los ensayos con este protocolo indican una sensibilidad del 56% y una especificidad del 100% frente al aislamiento viral. También con este protocolo, se logró la amplificación exitosa del RNA en una de cinco muestras provenientes de fatalidades sospechosas de dengue. Ninguno de estos sueros presentaba ensayo de aislamiento viral y todos habían sido remitidos del Instituto de

Medicina Legal por historia clínica y hallazgos patológicos. La prueba se realizó como un intento de confirmar al dengue hemorrágico como la causa del deceso. Los resultados indican la utilidad del ensayo en la confirmación de fatalidades atribuibles al dengue, en muestras que puedan presentar inactivación del virus por diferentes circunstancias.

Los estudios más sobresalientes en cuanto al uso de RT-PCR en muestras de un sistema de diagnóstico rutinario de vigilancia epidemiológica, exhiben mayores tasas de sensibilidad y especificidad respecto al aislamiento viral. Estos reportes presentan claras ventajas metodológicas en cuanto a logística, colecta y transporte de muestras que nuestro sistema de vigilancia no posibilita. Esto es claro en el estudio de Balsameda *et al.*, (1999), en el que la prueba de RT-PCR (protocolo de Lanciotti *et al.*, 1992) era desarrollada antes que el diagnóstico por aislamiento viral (estudio prospectivo) y contando con la ventaja de captar las muestras de pacientes sospechosos al poco tiempo de haber sido diagnosticados los casos (Balsameda *et al.*, 1999). Otra ventaja de los autores es que restringieron la selección de las muestras a aquellas tomadas hasta el 4º día de síntomas (Balsameda *et al.*, 1999). De esta forma se seleccionaron muestras en mejor estado y con títulos virales más altos que arrojaron sensibilidad de 100% y especificidad del 90%, lo cual plantea una gran diferencia de sensibilidad respecto al presente estudio.

Son pocos los estudios sobre diagnóstico por aislamiento viral y/o RT-PCR practicados con muestras clínicas en el marco de un sistema de vigilancia epidemiológica apoyado en la serología. Estos bajos niveles de sensibilidad arrojados por los protocolos ensayados en este estudio, son muy similares a los reportados en 1999 por el Centro Nacional de Enfermedades Tropicales de Bolivia (CENETROP) cuando se detectó mediante RT-PCR con dos enzimas en un tubo y los primers de Lanciotti, un suero positivo entre 60 (sensibilidad 1.6%) colectados en fase aguda. Es importante mencionar que las muestras fueron tomadas aleatoriamente de las anteriormente captadas por un estudio serológico, en condiciones de vigilancia rutinaria muy similares a las presentadas en nuestra localidad. Este constituyó el primer caso reportado de detección por este procedimiento en Bolivia (Peredo *et al.*, 1999).

El protocolo 1 presentó sesgo de muestra finita, que pudo haberse evitado aumentando el número de muestras con A.V. negativo. Sin embargo, la variedad de los valores de sensibilidad obtenida en los protocolos ensayados (protocolo 1: 34.6%, protocolo 2: 56%), sugieren diferencias reales al aumentar los tamaños de muestras en los ensayos y son consecuentes con los encontrados en otros estudios. En un reciente estudio en 2002, Raengsakulrach *et al.*, comparando cuatro protocolos RT-PCR de común uso y aceptación en diferentes laboratorios del mundo, encontraron que los protocolos más sensibles para el diagnóstico por RT-PCR del dengue eran

los que tenían la estrategia de una RT-PCR universal seguida por una PCR de anidación.

Aunque la baja prevalencia determinada por el aislamiento viral en la población de estudio (9.5%), tuvo un dramático efecto sobre los valores predictivos, en especial sobre el valor predictivo negativo, los valores de sensibilidad y especificidad de los 2 protocolos se correlacionan muy bien con sus respectivos índices de calidad. Esto es un indicador de que superando el sesgo de muestra finita al incluir más muestras en los ensayos, los valores crudos de sensibilidad y especificidad, por sí solos serían útiles descriptores aún ajustándolos al nivel de la prueba (Q).

La concordancia de los ensayos en términos de su eficiencia fue buena en el protocolo 2 (87%), mientras que en el protocolo 1 fue baja (59%). Esto pudo deberse a la baja sensibilidad que mostraron tener los dos métodos de amplificación en los que no superó el 56%.

Independientemente del sesgo de muestra finita, los resultados de los valores descriptores obtenidos para cada ensayo, indican que ninguno de los protocolos ensayados pueda ser recomendado como prueba de tamizaje diagnóstico, sino como prueba para la confirmación de la enfermedad, principalmente por su elevada especificidad (100%).

Los ensayos en 14 sobrenadantes (4 cepas de referencia y 10 de previos aislamientos virales) de cultivos infectados, indican una sensibilidad y especificidad del 100% en sobrenadantes de cultivos virales. Estos resultados sugieren que estos protocolos pueden ser útiles en la confirmación de cultivos virales y de su serotipo, lo cual potencialmente permitiría mejorar la calidad de detección del virus dengue del ensayo y/o la confirmación de casos, en especial el protocolo 1. Esto fue demostrado por De Paula *et al.*, (2003) detectando por RT-PCR hasta 8.5 veces más muestras positivas de DEN-1 que por inmunofluorescencia, además con menos de la mitad del tiempo de infección normalmente requerido.

Debido al peligro de contaminación cruzada del producto amplificado, se han observado en ocasiones resultados falsos positivos al aplicar la técnica de RT-PCR (Deubel *et al.*, 1990; Eldadah *et al.*, 1991). En este trabajo no se obtuvieron falsos positivos tal vez por precauciones como la separación física de la manipulación antes y después de la RT-PCR, la irradiación con luz UV de las áreas de reacción y la inclusión de diferentes tipos de controles durante los ensayos (Sambrook *et al.*, 1989; Dieffenbach & Dvskler, 1995). Estas medidas mostraron ser eficientes como lo indica el excelente nivel de especificidad de los protocolos RT-PCR ensayados (100%) tanto en sobrenadantes de cultivos como en muestras clínicas.

En el presente trabajo, se detectó además del producto PCR esperado para el serotipo DEN-2, otra banda de tamaño algo mayor, que se asumió como

un producto RT-PCR no específico. Lanciotti *et al.*, (1992), diseñaron los primers usando las cepas prototipo DEN-1 (Hawaii), DEN-2 (New Guinea C), DEN-3 (H-87), DEN-4 (H-241). Además incluyeron 33 cepas obtenidas de aislamientos virales de diferentes regiones geográficas para probar la eficacia de los primers diseñados. De acuerdo con este reporte, sólo se amplificó un producto PCR para la cepa DEN-2 de 119 pb, mientras que en el presente estudio la presencia de la banda inespecífica fue constante en todas las muestras ensayadas de este serotipo. Esto puede indicar que los primers de Lanciotti, se alinean al menos en dos sitios. Sin embargo deben realizarse otros estudios como el secuenciamiento de cepas para ser confirmado. Algo similar fue presentado por THAYRAN en 2001, al detectar un producto PCR inespecífico en una reacción RT-PCR con los primers universales de Lanciotti *et al.*, 1991.

Ninguno de los protocolos RT-PCR ensayados, amplificó muestras infectadas con el serotipo DEN-4 excepto en la cepa de referencia DEN-4 (H-241). La ausencia de sensibilidad para este serotipo en particular y con los *primers* de Lanciotti, no ha sido reportada. El hecho de que la única cepa DEN-4 amplificada exitosamente sea una de las utilizadas por Lanciotti y su grupo para diseñar los *primers* (Lanciotti *et al.*, 1992), plantea la posibilidad de que la ausencia de sensibilidad para este serotipo en particular observado en todos los procedimientos RT-PCR ensayados radique en una inadecuada homología en la secuencia de los *primers* con las de las cepas que de este serotipo circulan en la región. Similares resultados y observaciones fueron

presentados en el estudio de Raengsakulrach *et al.*, (2002), en el que se encontró que todos los protocolos ensayados presentaron baja sensibilidad para detectar un serotipo en particular comparado con los otros. Estudios de genotipificación podrían aclarar esta posibilidad.

Sabiendo que la señal de RNA es más estable que la infectividad en las muestras de sueros (Yamada *et al.*, 2002), una de las razones que puede explicar la baja sensibilidad de los ensayos es el tratamiento y conservación de las muestras antes de llegar al laboratorio. Yamada y otros plantean que las altas de aislamiento viral y de RT-PCR obtenidas, fueron posibles debido a las óptimas condiciones de transporte de las muestras al laboratorio (Yamada *et al.*, 2002). Esto es corroborado por Vaughan y otros (2002), cuyos resultados indican que aunque los resultados RT-PCR no varían por almacenamiento de la muestra a 4°C por más de una semana, los procesos de almacenamiento a temperaturas variables o la exposición continua a temperatura ambiente (25 °C) pueden disminuir la sensibilidad de la técnica de RT-PCR hasta en un 50% (Vaughan *et al.*, 2002).

Es probable que las muestras clínicas del sistema epidemiológico local y regional carezcan de las condiciones de tratamiento y conservación antes mencionadas. Según la Organización mundial de la salud, los sistemas de vigilancia epidemiológica basados en la serología presentan las siguientes limitaciones tanto para el aislamiento viral como para otras técnicas de detección directa como la RT-PCR (WHO, 1997): *i*) El tiempo de colecta de

las muestras es más flexible debido a que la respuesta de anticuerpos permanece hasta por varias semanas después de iniciados los síntomas, ii) Las inmunoglobulinas no son fácilmente inactivadas por los tratamientos inadecuados de las muestras, iii) Son resistentes al almacenamiento a temperaturas tropicales hasta por más de siete días, iv) los servicios serológicos son fácilmente disponibles y ampliamente distribuidos, v) Han sido empleados como método diagnóstico durante años por el sistema de vigilancia encontrándose ampliamente aceptado y establecido (WHO, 1997).

Del total de casos RT-PCR positivos obtenidos en el presente estudio, el 43.75% presentó ensayo de anticuerpos IgM negativo (Inconclusos). Esto se debió probablemente a que los niveles de anticuerpos se encuentran bajos o indetectables en sueros de fase aguda. Este elevada proporción de casos confirmados que no presentan niveles detectables de anticuerpos IgM, es consistente con las observaciones de Kuno, 1994 y Vaughn *et al.*, 1997 Chan *et al.*, 1994, donde se sugiere una correlación inversa entre el aislamiento viral y los niveles de anticuerpos anti-dengue. Debido a esto, las muestras destinadas tanto para aislamiento viral como para RT-PCR deben ser colectadas durante los tres primeros días de enfermedad, para asegurar muestras con elevada viremia y por ende resultados confiables.

Aunque es aceptado el diagnóstico presuntivo de infecciones agudas de dengue en monosueros (WHO, 1997), el diagnóstico concluyente sólo puede determinarse al observar aumento en los niveles de anticuerpos en sueros

pareados (WHO, 1997). Este diagnóstico presuntivo debe hacerse además teniendo en cuenta el día de toma de muestra.

Según la interpretación del ensayo ELISA-IgM realizada por el LDSP, del total de muestras captadas (483), aproximadamente 329 (68.11%) presentaron títulos detectables de anticuerpos IgM, por lo que estos casos son reportados como positivos para dengue y los 181 restantes (31.88%) son reportados como casos negativos para dengue por no presentar títulos detectables de anticuerpos. Sin embargo, este trabajo demostró que al menos el 43% de los ensayos RT-PCR positivos no tenía títulos detectables de anticuerpos. Estos resultados ponen de manifiesto fallas en la interpretación de los resultados del ensayo de ELISA IgM desarrollados en el LDSP.

Esta interpretación de resultados se basa en la lectura de un monosero y en su resultado en términos de positivo o negativo. De esta forma los casos sospechosos se clasifican como positivos o negativos, donde en estos últimos se incluyen los casos IgM negativos con ensayo RT-PCR positivo. Como consecuencia, el estimativo de la frecuencia del dengue en la región es menor al no considerar que pacientes con IgM negativa sufrieron la enfermedad.

La interpretación más apropiada del ensayo ELISA-IgM para las 483 muestras estudiadas es: 68.11% de casos probables y el restante 31.88%

(clasificado según el día de toma de muestra) se dividiría en, 1.01% de casos negativos y 32.52% de casos inconclusos. Los resultados de la RT-PCR indican fidelidad en la interpretación de los resultados teniendo en cuenta el nivel de especificidad y su índice respectivo, aunque con la salvedad de la baja prevalencia obtenida con el ensayo de A.V.

Las proporciones de casos con prueba RT-PCR positiva respecto a la positividad del ensayo de IgM (56.25% con anticuerpos IgM y 43.75% sin anticuerpos IgM) indican además, la posibilidad de obtener resultados positivos aún en presencia de anticuerpos inhibidores en la muestra.

El estudio presentado por Rossi *et al.*, (1998), determinó que el ensayo MAC-ELISA no es una herramienta útil para determinar el diagnóstico presuntivo en monosueros. Según el estudio, sólo el 13% de los aislamientos virales obtenidos presentaron niveles detectables de anticuerpos IgM. En un estudio similar realizado en el CINTROP recientemente, se sugirió que estos casos reportados como negativos por su ensayo de IgM podían disminuirse hasta en 3.6 veces si se utilizaba una prueba confirmatoria como el aislamiento viral (Fábregas *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de este trabajo, en la epidemia del 2001, se aisló el serotipo DEN-3 en el laboratorio de virología del CINTROP. Este serotipo no había sido detectado desde los años 70 en el país (Ministerio de Salud, 2002). La reaparición de este serotipo se asoció a la nueva epidemia, dado el

marcado aumento en la severidad y a la alta letalidad de la misma (Ocazonez *et al.*, 2002).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El dengue es la enfermedad de mayor incidencia en Bucaramanga y su área metropolitana. Este es el primer estudio sobre la utilidad de la RT-PCR para diagnóstico del dengue en muestras clínicas que se realiza en la región, por esto a pesar de las limitaciones del análisis debidos a los tamaños de muestra, se constituye en un trabajo base para los estudios relacionados con este campo de la investigación epidemiológica del dengue.

Según los resultados obtenidos, la utilidad de la RT-PCR como tecnología diagnóstica del virus dengue y su serotipo está limitada por las condiciones del sistema de vigilancia epidemiológica regional centralizado en la serología, que actualmente, no permite la adaptación de otros criterios de vigilancia basados en la detección directa del virus como son el aislamiento viral y la RT-PCR.

Según los índices de sensibilidad y especificidad determinados, ninguno de estos protocolos RT-PCR ensayados es apropiado para ser utilizado como prueba de tamizaje, es decir que no pueden hacer parte de la estrategia de

diagnóstico inicial del dengue, sino que deben utilizarse sólo como prueba confirmatoria, dada su elevada especificidad. Por esta razón deberían intentarse ciertas mejoras en el ensayo RT-PCR anidada (protocolo 2) antes que con el otro protocolo ensayado.

A pesar del sesgo de muestra finita, el índice de sensibilidad del protocolo 1 RT-PCR multiprimer de una enzima (rTth) resultó ser mucho menor al del protocolo 2 RT-PCR anidada de dos enzimas (AMV y Taq gold), es decir 34.6 y 56% respectivamente. Aunque el aumento en el número de muestras ensayadas mejore los niveles de sensibilidad, en ambos protocolos, la evidente diferencia de sensibilidad probablemente permanecería constante.

El uso del ensayo RT-PCR podría mejorar y confirmar hasta en un 43.75% el diagnóstico de casos inconclusos de dengue. Como consecuencia, el estimativo de la frecuencia del dengue en la región es menor al no considerar que pacientes con IgM negativa sufrieron la enfermedad.

Todos los ensayos RT-PCR en sobrenadantes mostraron tener 100% de especificidad y 100% de sensibilidad con todos los serotipos a excepción del serotipo DEN-4. Esto puede ser debido a la circulación en la región de una cepa que tiene poca homología con la secuencia del primer. A pesar de esto, el ensayo RT-PCR multiprimer con la enzima rTth puede ser propuesto como prueba confirmatoria de cultivos virales y de su serotipo en lugar de la

inmunofluorescencia, lo cual potencialmente permitiría mejorar la calidad de detección del virus dengue del ensayo y/o la confirmación de casos.

Con la RT-PCR practicada en aislamientos virales, se logra identificar más cepas virales más rápidamente permitiendo detectar la circulación de un nuevo serotipo cuando la transmisión se inicia o es muy baja, teniendo en cuenta su mayor sensibilidad comparada con el aislamiento en cultivo de células e inmunofluorescencia (Vorndam & Kuno, 1997; Guzmán & Kourí, 1996; Gubler, 1998).

Es necesario hacer más estudios y aumentar el número de muestras ensayadas por los protocolos RT-PCR para determinar valores más significativos de sensibilidad y especificidad.

Los resultados negativos en la amplificación de cepas con el serotipo DEN-4 pueden estar relacionados con la circulación en la región de cepas que guardan relativamente poca homología con los *primers* utilizados en el estudio.

En este estudio se demostró que el uso de tecnologías diagnósticas como la RT-PCR en combinación con el aislamiento viral y la ELISA IgM, pueden incrementar la seguridad y sensibilidad del diagnóstico por laboratorio de infecciones por dengue.

8. BIBLIOGRAFÍA

BALSAMEDA, Angel., SANDOVAL, Erick., PÉREZ, Leonel., GUTIÉRREZ, Claudia Milena., HARRIS, Eva. Application of Molecular Typing Techniques in the 1998 Dengue Epidemic In Nicaragua. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1999)**, Vol. 61(6), p. 893-897.

BOONPUCKNA.V.IG, Somnate., VUTTIVIROJ, Oranut., BOONPUCKNAVIG, Vijitr. Infection of adult mice with dengue virus type 2. En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **(1981)**; Vol. 75 (5), p. 647-653.

BRAVO, Jose R., GUZMÁN, Maria Guadalupe., KOURÍ, Gustavo, P. Why dengue hemorrhagic in Cuba? I. Individual risk factors for dengue Haemorrhagic fever/dengue Shock syndrome (DHF/DSS). En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **(1987)**; Vol. 81, p. 816-820.

CUSSI, M.G., VALASSINA, Marcella. VALENSIN, P.N. Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden. En: Biotechniques. (1994); Vol.17, p. 1034-1036.

CUZZUBO, A.J., VAUGHN, David W., NISALAK, Ananda., SUNTAYAKORN, Saroj., AASKOV, John G., DEVINE, P.L. Detection of especific antibodies in saliva during dengue infection. En: Journal of Clinical Microbiology. (1998); Vol. 36, p. 3737-9.

CHA, Rita S, THILLY, William, G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. En: Dieffenbach, Carl W. AND Dveksler, Gabriela S. eds. PCR Primer: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press, (1995); 37–52.

CHAIRULFATAH, Alex., DJATNIKA, Setiabudi., RIDAD, Agoes., Sprundel, Marc van., Colebunders, Roberts. Hospital based clinical surveillance for dengue hemorrhagic fever in Bandung, Indonesia 1994-1995. En: Acta Tropica. (2001), Vol. 80, p. 111-115.

CHAN, Suk Yin., KAUTNER, Ingrid Maria., LAM, Sai-Kit. The influence of antibody levels in dengue diagnosis by polymerase chain reaction. En: Journal of Virological Methods. (1994); Vol. 49, p. 315-322.

CHEN, Yaping., MAGUIRE, Terry., AND MARKS, Rory M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. En: Journal of Virology. (1996); Vol. 70, p. 8765–8772.

CHIOCCHIA, Gilles., SMITH, Kent A. Highly sensitive method to detect mRNA in individual cells by direct RT-PCR using Tth DNA polymerase. En: BioTechniques, (1997); Vol. 22, p. 312–317.

CHOW, Vincent T., CHAN, Y C., YONG, Rita., LEE, K.M., CHUNG, Y.K., LAM-PHUA, S.G., TAN, B. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. (1998); Vol. 58(5): 578-586.

CHUNGUE, Eliane., MARCHE, G., PLICHART, R., BOUTIN, Jean Pierre AND ROUX, J. Comparisons of immunoglobulin G enzyme linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and Hemagglutination Inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. (1989); Vol. 83, p. 708-771.

CHUNGUE, Eliane., BURUCOA C, BOUTIN JP, PHILIPPON G, LAUDON F, PLICHART R, BARBAZAN P, CARDINES Rita, ROUX J.. Dengue 1 epidemic in French Polynesia, 1988–1989: surveillance and clinical,

epidemiological, virological and serological findings in 1752 documented clinical cases. En: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. (1992); Vol. 86, p. 193–197.

CHUNGUE, Eliane., ROCHE, Claudine., LEFEVRE, Marie-France., BARBAZAN, P., CHANTEAU, Suzanne. Ultra-Rapid, Simple, Sensitive and Economical Silica Method for the Extraction of Dengue Viral RNA From Clinical Specimens and Mosquitoes by Reverse Polymerase Chain Reaction. En: Journal of Medical Virology. (1993); Vol. 40, p. 142-145.

DE PAULA, Sergio O., NUNES, Camila., MATOS, Rosemary., MACHADO, Zilda., LIMA, Danielle Malta., DA FONSECA, Benedito Anatônio. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. En: Journal of Virological Methods. (2001); Vol. 98, p. 119-125.

DE PAULA, Oliveira S., MALTA LIMA, Danielle., CLOTTEAU, Marilidia., PIRES NETO, Roberto Da Rusta., LOPES DA FONSECA, Benedito Anatônio. Improved detection of dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. En: Intervirology. (2003); Vol. 46(4), p. 227-31.

DEUBEL Vincent., LAILLE Manola., HUGNOT Jean Philippe., CHUNGUE Eliane., GUESDON, Jean-Luc., DROUET, Marie Thérèse., BASSOT,

Sylviane., CHEVRIER, Danièle. Identification of dengue sequences by genomic amplification: Rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. En: Journal of Virological Methods. (1990); 30, p. 41 -54.

DIEFFENBACH, CARL W. AND DVEKSLER, GABRIELA S. PCR Primer: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press, (1995); 714p.

EIDADAH, Zayd A., ASHER, David M., GODEC, M.S., POMEROY, K.L., GOLDFARB, Leah G., FEINSTONE, S.M., LEVITAN, H., GIBBS, Clarence J., GAJDUSEK, D.C. Detection of Flaviviruses by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. En: Journal of Medical Virology. (1991); Vol. 33, p. 260-267.

ERLICH, Henry A., GELFAND, David H. SNINSKY, Jhon J. Recent advances in the polymerase chain reaction. En: Science. (1991); Vol. 252, p. 1643-1651.

FÁBREGAS, Ricardo Fabian., CORTÉZ, Fabian Mauricio., OCAZONEZ, Raquel Elvira., ÁLVAREZ, Andrés. Respuesta de anticuerpos Inmunoglobulinas M (IgM) anti-dengue en casos con síndrome febril y su utilidad en casos con síndrome febril y su utilidad en la vigilancia serológica del dengue. En: Infectio: III ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS. (F-2: **Junio de 2002:** Popayán). Vol. 6, (2), p. 109.

FAKEEH, Mazen. AND ZAKI, Ali Mohamed. Virologic and serologic for dengue fever in Jeddah, Saudi Arabia, 1994-1999. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(2001)**; Vol. 65(6), pp. 764–767.

FIGUEREIDO, Luiz Tadeu., BATISTA, Weber Chelli., KASHIMA, Simone., NASSAR, Elsa Da Silva. Identification of Brazilian Flaviviruses by a Simplified Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Method Using Flavivirus Universal Primers. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1998)**; Vol. 59 (3) p. 357-362.

FROHMAN, Michael A., DUSH, Michael K., MARTIN, Gail R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcriptions: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. En: Proc. Nat. Acad. Sci. **(1988)**; Vol. 85, p. 89-98.

FUJITA, Nobuya., HOTTA, Susumu., KONISHI, Eiji., ESAKI, Hisao., SUMARMO. AND SUJUDI. Dengue hemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia in 1988: Isolation of dengue virus from patient whole blood cell cultures. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1997)**; Vol. 56(3), p. 318-321.

GUBLER, Duane J., KUNO Goro, SATHER G.E., et al., Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue

viruses. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1984)**; Vol. 33(1), p. 158-165.

GUBLER, Duane J. Dengue. En: Monath, T.P. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology Vol. II. CRC Press, Florida **(1988)**; pp. 223-260.

GUBLER, Duane J., SATHER, GE. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue. Rio de Janeiro, Brazil; 1988 May 15-19. Bio-Manguinhos. **(1988)**; p. 291-322.

GUBLER, Duane J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. En: Clinical Microbiology Reviews. **(Julio, 1998)**; Vol. 11, p. 480-496.

GUBLER, Duane J., SUHARYONO, W., TAN, Rei Chin How., ABIDIN, M., SIE, A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. En: Bulletin of the World Health Organization **(1981)**; Vol. 59 (4), p. 623 – 630.

GUZMÁN, Maria G., KOURÍ, Gustavo., SOLER, Maritza., MORIER, Luis., VÁZQUEZ, Susana. Aislamiento del virus dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2. En: Revista Cubana de Medicina Tropical. **(1984)**; Vol. 36, p. 4-10.

GUZMÁN, Maria G., & KOURÍ, Gustavo. Advances in Dengue Diagnosis. En: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. **(1996)**; Vol. 3, (6) p. 621-627.

GUZMÁN, Maria G., VÁZQUEZ, Susana. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. En: Revista Cubana de Medicina Tropical. **(2002)**; Vol. 54, (3) p. 180-88.

HALSTEAD, Scott B., PORTERFIELD, J.S., O`ROURKE, E.J. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1980)**; Vol. 29, p. 638-642.

HALSTEAD, Scott B., ROJANASUPHOT, S AND SANGKAWIBBA, N. Original antigenic sin in dengue. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **(1983)**; Vol. 32, p. 154-156.

HALSTEAD, Scott B.,. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. En: Science. **(1988)**; Vol. 239, p. 476–481.

HALSTEAD, Scott B.,. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. En: Rev Infect Dis **(1989)**; Vol. 11, p. S830–S839.

HARRIS, Eva., ROBERTS, T. Guy., SMITH, Leila., SELLE, Jhon., KRAMER, Laura D., VALLE, Sonia., SANDOVAL, Erick., AND BALMASEDA, Angel. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. En: Journal of Clinical Microbiology (**Septiembre, 1998**); Vol. 36, p. 2634–2639.

HENCHAL, Erick A., NARUPITIS, R. FEIGHNY, R., PADMANABHAN., VAKHARIA, V. Detection of dengue virus RNA using nucleic acids hybridization. En: Journal of Virological Methods (**1987**); Vol. 15, p. 187-200.

HENCHAL, Erick A., AND PUTNAK, J. Robert. The dengue Viruses. En: Clinical Microbiology Reviews. (**1990**); Vol 3, p. 376-396.

INNIS, Bruce L. Dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Portersfield JS, ed. Exotic Viral Infections. London, United Kingdom. Chapman and Hall, (**1995**): 103-146. ISBN 0 412 63030 3.

IPK. Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización del Virus Dengue. Ciudad Habana. Laboratorio de Arbovirus, Dpto de Virología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. (**1997**).

JARAMILLO, A.C., SANDOVAL, L., VARELA, A., Velásquez, L.S., JIMÉNEZ, Y. Detección y tipificación por un PCR anidado en muestras de suero de pacientes con dengue y dengue hemorrágico: informe de progreso.

En: Infectio: III ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS. (F-4: **Jun, 2002**: Popayán). Vol. 6, (2), p. 110.

KHAN, A.M., WRIGHT, P.J. Detection of Flavivirus RNA in infected cells using photobiotin-labelled hybridization probes. En: Journal of Virological Methods. (**1987**); Vol. 15, p. 121-130.

KRAEMER, Helena Chmura. Evaluating Medical Tests: Objective and Quantitative Guidelines. Newbury Park: Sage Publications, (**1992**); 130p.

KOURÍ, Gustavo., GUZMÁN, Maria Guadalupe., BRAVO, Jose R. Criterios utilizados durante la epidemia de dengue hemorrágico para definir los casos positivos y las respuestas primarias y secundarias en la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Cuba 1981. En: Revista Cubana de Medicina Tropical. (**1983**); Vol. 35, p. 4-10.

KUBERSKY T.T., ROSEN, Leon. A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. (**1977**); Vol. 26, p. 533-537.

KUNO, Goro., GUBLER, Duane J., VELEZ, M., AND OLIVER, A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue

viruses. En: Bulletin of the World Health Organization. **(1985)**; Vol. 63, p. 279-286.

KUNO, Goro. Manual of Fluorescence Techniques with an Emphasis on Dengue Diagnosis. Dengue Branch, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, Centers for Disease Control. **(1990)**.

KUNO, Goro. GOMEZ I, GUBLER Duane J.,. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infection. En: Journal of Virological Methods **(1991)**; Vol. 33, p. 101–113.

KUNO, Goro. Studies of Anti-Dengue IgM: A training manual. Dengue Branch, Division of Vector-Borne Viral Diseases, Centers for Infectious Diseases, Center for Disease Control **(1994)**.

KUNO, Goro. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. En: Journal of Virological Methods. **(1998)**; Vol. 72, p. 27-41.

KURANE, Ichiro., INNIS, Bruce L., NIMMANNITYA, Suchitra., et al., Activation of T lymphocytes in dengue virus infections: high levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. En: Journal of Clinical Investigation **(1991)**; Vol. 88, p. 1473–80.

KURANE, Ichiro., ENNIS, Francis A. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. En: Seminars in Virology. (1994); Vol. 5, p. 443–8.

KURANE, Ichiro., AND ENNIS, Francis A.,. Immunopathogenesis of dengue virus infections, En: D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford, UK: CAB International, London, United Kingdom. (1997); p. 73–290.

LANCIOTTI, Robert S., CALISHER, Charles H., GUBLER, Duane J., CHANG, Gwong-Jen., AND VORNDAM, Vance. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. En: Journal of Clinical Microbiology. (1992); Vol. 30, p. 545-551.

MINISTERIO DE SALUD. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD INS. Informe quincenal epidemiológico nacional. Bogotá, Colombia. (2002); Semana Epidemiológica No. 02.

MORITA, Kouchi., MAEMOTO, Tatsuo., HONDA, Shoji., ONISHI, Kenji., MURATA, Misako., TANAKA, Mariko., IGARASHI, Akira. Rapid Detection of Virus Genome From Imported Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Patients by Direct Polymerase Chain Reaction. En: Journal of Medical Virology (1994); Vol. 44, p. 54-58.

MULLIS, Kary B., FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. En: Methods Enzymol. (1987); Vol. 155: p. 335-350.

MYERS, T.W. AND GELFAND, David H. Reverse Transcription and ADN amplification by a *Thermus thermophilus* ADN polymerase. En: Biochemistry (1991); Vol. 30. p. 7661-7666.

NAGARKATTI, P.S., NAGARKATTI, S., RAO, K.M. Development of a kit for the assay of haemagglutination inhibition antibodies to flaviviruses using formalinized goose erythrocytes. En: Transactions of the American Journal of tropical Medicine and Hygiene. (1980); Vol. 74 (1), p. 22-25.

NIMMANNITYA, Suchitra. Dengue hemorrhagic fever: Disorders of hemostasis. (Oct. 24-28, 1999).

NOGUEIRA, Maria Rita., SCHATZMAYR, Hermann, G., MIAGOSTOVICH Marize P., FARIAS Maria de Fátima D.B., FARIAS, José da Costa, filho. Virological study of dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. En: Mem. Inst. Oswaldo Cruz. (1988); Vol. 83, p. 219-225.

OCAZIONEZ, Raquel Elvira., ÁLVAREZ, Andrés. CORTÉZ, Fabian Mauricio., FÁBREGAS, Ricardo Fabian. Asociación entre circulación de serotipos de virus dengue y ocurrencia de epidemias con aumento de casos

severos. En: Infectio: III ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS. (F-3: **Junio de 2002**: Popayán). Vol. 6, (2), p. 110.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OPS. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington: La organización. (**1994**); Publicaciones científicas N° 548.

OROZCO, Luis C., CAMARGO, Diana M. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreos. En: Biomédica. (**1997**); 17(4) p. 321-324.

PEREDO, Carlos., GARRÓN, Tania., PELEGRINO, Jose Luis., HARRIS, Eva., GIANELLA, Alberto. Detection and identification of dengue-2 virus from Santa Cruz-Bolivia by a single tube RT-PCR method. En: Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo (**Mayo- Junio, 1999**); 41(3) p. 207-208.

PODDAR, S.K., SAWYER, M.H., CONNOR, J.D. Effects of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus. En: Journal of Medical Microbiology , (**1998**); Vol. 47, p. 1131-1135.

RAENGSAKULRACH Boonyos, NISALAK, Ananda., MANEEKARN, Niwat., YENCHITSOMANUS, Pa-thai., LIMSOMWONG, Chandhana., JAIRUNGSRI, Aroonroong., THIRAWUTH, Vipa., GREEN, Sharone., KALAYANAROOJ, Siripen., SUNTAYAKORN, Saroj., SITTISOMBUT,

Nopporn., MALASIT, Prida, VAUGHN, David W. Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. En: Journal of Virological Methods. **(Sep, 2002)**; Vol. 105(2), p. 219-32.

RAVINDRAN, Thayran. Optimized Dengue RT-PCR : Optimization of annealing temperature for Dengue RT-PCR by using Eppendorf's Mastercycler[®] gradient [online]. Brinkmann Instruments, Inc. Disponible de la Internet en: http://www.brinkmann.com/PCR_appl_denguet.asp.

RICCO-HESSE Rebeca., HARRISON, L.M., SALAS, Rosa Alba, TOVAR D, NISALAK, Ananda., RAMOS, Celso. et al., Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. En: Virology, **(1997)**; Vol. 230, p. 244-51.

RIGAU-PEREZ, José G., CLARK, Gary G., GUBLER, Duane J., REITER, Paul., SANDERS, Eduard., VORNDAM, Vance. Dengue and dengue hemorrhagic fever. En: The Lancet. **(Septiembre, 1998)**; Vol. 352, p. 971-977.

RODRÍGUEZ, R. Rosmari., ÁLVAREZ, Mailing., GUZMÁN, Maria G., MORIER, L., KOURÍ, Gustavo. Isolation of dengue 2 in C6/36-HT cells by

rapid centrifugation assay. Comparison with conventional virus isolation method. En: Journal of Clinical Microbiology. **(2000)**; Vol. 38, p. 3508-10.

ROSARIO, Delfina., ÁLVAREZ, Mayling., DÍAZ, Javier., CONTRERAS, Rodolfo., RODRÍGUEZ, Rosmari., VÁZQUEZ, Susana., GUZMÁN, Maria Guadalupe. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo de virus del dengue en muestras clínicas. En: Revista Panamericana de Salud Pública. **(1998)**; Vol. 4 p.1-5.

ROSEN, Leon. The emperors new Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1977)**; Vol. 26, p. 337-343.

ROSEN, Leon. AND GUBLER, Duane J. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **(1974)**; Vol. 23, p. 1153-1160.

ROSEN, Leon. The pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: a critical appraisal of current hypotheses. En: S Afr Med J, **(1986)**; (Suppl):40–2.

ROSSI, Cynthia A., DRABICK, Joseph J., GAMBEL, Jeffrey M., SUN, Wellington., LEWIS, Tamara E., HENCHAL, Erick A. Laboratory diagnosis of acute dengue fever during the united nations mission in Haiti, 1995-1996.

En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. (1998); Vol. 59(2), p. 275-278.

RUSSELL, Philip., UDOMSAKIDI, Suchinda., HALSTEAD, Scott B. Antibody response in dengue and dengue hemorrhagic fever. En: JPN J MED SCI BIOL (1967); Vol. 20, p. 103–108.

SAIKI, Randall K., GELFAND, David H., STOFFEL, Sussane., SCHARF, Stephen J., HIGUCHI, Russell., HORN, Glenn T., MULLIS, Kary B., ERLICH Henry A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. En: Science. (1988); Vol. 239, p. 487-491.

SALAS, R.A., TOVAR, D., BARRETO, A., DE MILLER, Edith., LEITMEYER, Katrin C., RICO-HESE, Rebeca. Serotypes and genotypes of dengue virus circulating in Venezuela, 1990-1997. En: Acta Científica de Venezuela. (1998); Vol. 49, Suppl 1, p. 33-37.

SAMBROOK, Joseph., FRITSCH, E.F., MANIATIS, Tom. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

SHEPS, Samuel. B., SCHECHTER, Martin. T. The assessment of diagnostic test, A survey of current medical research. En: JAMA. (Nov 2, 1984) Vol 252, N° 17, p. 2418-2422.

SINGH, K.R.P., AND PAUL, S.D. Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. En: Bulletin W.H.O. (1969); Vol. 40, p. 982-983.

SOLER, Maritza., GUZMÁN, Maria Guadalupe., MORIER, D. Luis., KOURÍ, Gustavo. Utilización de los anticuerpos monoclonales para la identificación mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de varias cepas de dengue aisladas durante la epidemia de fiebre hemorrágica en cuba, 1981. En: Revista Cubana de Medicina Tropical. (1985); Vol. 37, p. 546-51.

SONGEE L. BRANCH AND PAUL N. LEVETT Evaluation of Four Methods for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Dengue Virus. En: Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. (July 1999); p. 555–557.

TANG, Yi Wei., PROCOP, Gary W. PERSING, David H. Molecular diagnostic of infectious diseases. En: Clin Chem. (1997);Vol. 43, p. 021-2038.

TESH RE,. A method for the isolation and identification of dengue viruses using mosquito cell culture. En: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. (1979); Vol. 28, p. 1053–1059.

THISYAKORN, U., AND NIMMANNITYA, Suchitra. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. En: Clin Infect Dis (1993); Vol. 16, 295-7.

VARMA, MGR, PUDNEY, Mary., LEAKE, C.J. Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malayensis* Colless and *Aedes (S.) pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arboviruses. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **(1974)**; Vol. 68(5), p. 374-382.

VAUGHAN H.E., GEORGE, A., MORRIS-GLASGOW V., CAMPIONE-PICCARDO J. Molecular diagnosis of dengue by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. En: West Indian Medical Journal. **(Sep, 1999)**; Vol. 48(3), p. 118-22.

VAUGHN, David W., GREEN, Sharone, KALAYANAROOJ, Siripen., INNIS, Bruce L., NIMMANNITYA, Suchitra., SUNTAYAKORN, Saroj., ROTHMAN, Alan L., ENNIS, Francis A., NISALAK, Ananda. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. En: Journal of Infectious Diseases. **(1997)**; Vol. 176, p. 322–30.

VORNDAM, Vance., KUNO, Goro. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler, D.J., Kuno, G, eds. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford, UK: CAB International, **(1997)**; 313-333.

WESTAWAY, Edwin G., AND J. BLOK.. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. En: Gubler, D.J., Kuno, G, eds. Dengue and

dengue hemorrhagic fever. Wallingford, UK: CAB International, (1997); p. 147–173.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue Hemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control. (1997). 2^o edition, Geneva.

YAMADA, Ken-ichiro., TAKASAKI, Tomohiko., NAWA Masaru., KURANE, Ichiro. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. En: Journal of Clinical Virology (2002) 24: p. 203-209.

ANEXO 1

Relación de todos los ensayos desarrollados con las diferentes muestras y protocolos de amplificación.

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	00-010	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.431	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-010	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.431	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-031	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	1.521	Probable	Pos	10	No
AMV - Taq	Suero	00-031	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	1.521	Probable	Pos	10	No
AMV - Taq	Suero	00-050	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	0	0.135	Inconcluso	Neg	15	Si
AMV - Taq	Suero	00-050	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	0	0.135	Inconcluso	Neg	15	Si
AMV - Taq	Suero	00-114	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.073	Inconcluso	Neg	4	Si
AMV - Taq	Suero	00-114	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.073	Inconcluso	Neg	4	Si
AMV - Taq	Suero	00-132	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.146	Inconcluso	Neg	13	No
AMV - Taq	Suero	00-132	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.146	Inconcluso	Neg	13	No
AMV - Taq	Suero	00-159	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.493	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	00-159	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.493	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	00-162	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	6	3.263	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	00-162	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	6	3.263	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	00-163	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	0.154	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	00-163	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	0.154	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	00-167	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.580	Probable	Pos	14	No
AMV - Taq	Suero	00-167	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.580	Probable	Pos	14	No
AMV - Taq	Suero	00-179	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	6	2.307	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	00-179	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	6	2.307	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	00-187	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.314	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-187	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.314	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-192	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.511	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	00-192	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.511	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	00-201	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.733	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	00-201	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.733	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	00-204	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	1.735	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	00-204	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	1.735	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	00-233	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.001	Inconcluso	Neg	12	Si
AMV - Taq	Suero	00-233	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.001	Inconcluso	Neg	12	Si

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	00-257	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	2.717	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	00-257	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	2.717	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	00-258	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	2.081	Probable	Pos	8	Si
AMV - Taq	Suero	00-258	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	2.081	Probable	Pos	8	Si
AMV - Taq	Suero	00-268	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.424	Probable	Pos	15	Si
AMV - Taq	Suero	00-268	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.424	Probable	Pos	15	Si
AMV - Taq	Suero	00-270	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	5	0.000	Inconcluso	Neg	6	Si
AMV - Taq	Suero	00-270	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	5	0.000	Inconcluso	Neg	6	Si
AMV - Taq	Suero	00-273	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.053	Inconcluso	Neg	8	Si
AMV - Taq	Suero	00-273	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.053	Inconcluso	Neg	8	Si
AMV - Taq	Suero	00-278	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.862	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-278	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.862	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-285	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.105	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	00-285	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.105	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	00-304	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.531	Probable	Pos	9	No
AMV - Taq	Suero	00-304	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.531	Probable	Pos	9	No
AMV - Taq	Suero	00-308	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.179	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	00-308	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.179	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	00-322	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.479	Probable	Pos	10	?
AMV - Taq	Suero	00-322	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.479	Probable	Pos	10	?
AMV - Taq	Suero	00-325	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	1.040	Probable	Pos	3	No
AMV - Taq	Suero	00-325	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	1.040	Probable	Pos	3	No
AMV - Taq	Suero	00-332	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.479	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	00-332	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.479	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	00-342	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	6	0.731	Probable	Pos	14	No
AMV - Taq	Suero	00-342	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	6	0.731	Probable	Pos	14	No
AMV - Taq	Suero	00-345	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.738	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-345	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.738	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	00-346	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.376	Probable	Pos	10	No
AMV - Taq	Suero	00-346	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.376	Probable	Pos	10	No
AMV - Taq	Suero	00-347	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	1.967	Probable	Pos	9	No
AMV - Taq	Suero	00-347	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	1.967	Probable	Pos	9	No
AMV - Taq	Suero	00-348	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.218	Inconcluso	Neg	10	No
AMV - Taq	Suero	00-348	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.218	Inconcluso	Neg	10	No
AMV - Taq	Suero	00-349	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.752	Probable	Pos	21	No
AMV - Taq	Suero	00-349	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.752	Probable	Pos	21	No
AMV - Taq	Suero	00-357	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.905	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	00-357	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.905	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	00-399	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.020	Probable	Pos	28	No
AMV - Taq	Suero	00-399	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.020	Probable	Pos	28	No
AMV - Taq	Suero	00-414	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.653	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	00-414	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.653	Probable	Pos	?	?

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	00-430	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.249	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	00-430	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.249	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	00-494	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	1.194	Probable	Pos	9	Si
AMV - Taq	Suero	00-494	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	1.194	Probable	Pos	9	Si
AMV - Taq	Suero	01-001	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	2.199	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	01-001	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	2.199	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	01-028	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	0	0.120	Inconcluso	Neg	17	Si
AMV - Taq	Suero	01-028	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	0	0.120	Inconcluso	Neg	17	Si
AMV - Taq	Suero	01-045	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	1.712	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	01-045	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	1.712	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	01-047	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.000	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-047	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.000	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-050	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.000	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-050	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.000	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-068	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	0	0.039	Inconcluso	Neg	9	Si
AMV - Taq	Suero	01-068	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	0	0.039	Inconcluso	Neg	9	Si
AMV - Taq	Suero	01-069	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	?	Inconcluso	Neg	?	Si
AMV - Taq	Suero	01-069	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	?	Inconcluso	Neg	?	Si
AMV - Taq	Suero	01-072	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	5	1.695	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	01-072	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	5	1.695	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	01-107	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.020	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-107	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.020	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-113	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.500	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	01-113	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.500	Probable	Pos	10	Si
AMV - Taq	Suero	01-129	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	6	0.479	Probable	Pos	13	No
AMV - Taq	Suero	01-129	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	6	0.479	Probable	Pos	13	No
AMV - Taq	Suero	01-142	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	4	0.082	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	01-142	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	4	0.082	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	01-154	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	2	0.316	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	01-154	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	2	0.316	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	01-163	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	0.874	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	01-163	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	0.874	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	01-168	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	2	0.086	Inconcluso	Neg	1	No
AMV - Taq	Suero	01-168	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	2	0.086	Inconcluso	Neg	1	No
AMV - Taq	Suero	01-212	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.026	Inconcluso	Neg	8	Si
AMV - Taq	Suero	01-212	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.026	Inconcluso	Neg	8	Si
AMV - Taq	Suero	01-270	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	0.214	Inconcluso	Neg	5	No
AMV - Taq	Suero	01-270	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	0.214	Inconcluso	Neg	5	No
AMV - Taq	Suero	01-308	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	2.288	Probable	Pos	2	?
AMV - Taq	Suero	01-308	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	2.288	Probable	Pos	2	?
AMV - Taq	Suero	01-355	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	0	0.095	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	01-355	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	0	0.095	Inconcluso	Neg	?	?

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	02-007	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.040	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	02-007	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.040	Inconcluso	Neg	?	?
AMV - Taq	Suero	02-011	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	1.580	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-011	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	1.580	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-024	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.409	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-024	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.409	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-067	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.990	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-067	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.990	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-084	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	0.020	Inconcluso	Neg	5	No
AMV - Taq	Suero	02-084	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	0.020	Inconcluso	Neg	5	No
AMV - Taq	Suero	02-092	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	2	?	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-092	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	2	?	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-095	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	3	?	Probable	Pos	1	?
AMV - Taq	Suero	02-095	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	3	?	Probable	Pos	1	?
AMV - Taq	Suero	02-107	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	1.419	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	02-124	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	4	?	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	02-124	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	4	?	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	02-132	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	1	?	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-132	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	1	?	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-135	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	1.07	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-148	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.020	Probable	Neg	10	Si
AMV - Taq	Suero	02-148	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.020	Probable	Neg	10	Si
AMV - Taq	Suero	02-165	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	2.870	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-165	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	2.870	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-170	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	2.870	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-170	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	2.870	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-178	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.900	Probable	Pos	3	?
AMV - Taq	Suero	02-178	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.900	Probable	Pos	3	?
AMV - Taq	Suero	02-227	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.033	Probable	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-227	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.033	Probable	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-232	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.904	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-232	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.904	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-234	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	?	Probable	Pos	5	?
AMV - Taq	Suero	02-234	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	?	Probable	Pos	5	?
AMV - Taq	Suero	02-240	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.528	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-240	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.528	Probable	Pos	7	No
AMV - Taq	Suero	02-247	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	2.020	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	02-247	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	2.020	Probable	Pos	5	No
AMV - Taq	Suero	02-251	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.016	Probable	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	02-251	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.016	Probable	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	02-261	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	1.451	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-261	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	1.451	Probable	Pos	4	No

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	02-262	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	0.098	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	02-262	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.098	Inconcluso	Neg	4	No
AMV - Taq	Suero	02-263	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	1.519	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-263	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	1.519	Probable	Pos	4	No
AMV - Taq	Suero	02-264	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.414	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-264	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.414	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-265	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.432	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-265	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.432	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-266	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.359	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-266	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.359	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-268	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.560	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-268	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.560	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-270	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.435	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-270	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.435	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-272	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	1.510	Probable	Pos	3	No
AMV - Taq	Suero	02-272	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	1.510	Probable	Pos	3	No
AMV - Taq	Suero	02-273	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.341	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-273	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.341	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-274	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.048	Inconcluso	Neg	1	No
AMV - Taq	Suero	02-274	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.048	Inconcluso	Neg	1	No
AMV - Taq	Suero	02-275	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.510	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-275	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.510	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-276	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.506	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-276	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.506	Probable	Pos	1	No
AMV - Taq	Suero	02-288	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.069	Probable	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-288	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.069	Probable	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-291	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.065	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-291	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.065	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-310	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.415	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	02-310	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.415	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	02-311	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.391	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	02-311	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.391	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	02-317	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos	2	0.059	Inconcluso	Neg	6	No
AMV - Taq	Suero	02-317	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos	2	0.059	Inconcluso	Neg	6	No
AMV - Taq	Suero	02-365	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	2	0.193	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	02-365	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	2	0.193	Inconcluso	Neg	8	No
AMV - Taq	Suero	02-366	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	1	0.057	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-366	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	1	0.057	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-368	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.515	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	02-368	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.515	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	02-369	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.219	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	02-369	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.219	Inconcluso	Neg	7	No

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
AMV - Taq	Suero	02-374	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	2.350	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	02-374	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	2.350	Probable	Pos	2	No
AMV - Taq	Suero	98-023	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	1.516	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-023	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	1.516	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-024	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.514	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	98-024	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.514	Probable	Pos	8	No
AMV - Taq	Suero	98-045	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.025	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	98-045	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.025	Inconcluso	Neg	7	No
AMV - Taq	Suero	98-120	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	2.989	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-120	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	2.989	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-149	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.730	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-149	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.730	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-193	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	5	1.712	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-193	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	1.712	Probable	Pos	?	?
AMV - Taq	Suero	98-197	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	1.040	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	98-197	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	1.040	Probable	Pos	6	No
AMV - Taq	Suero	99-005	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	5	0.145	Inconcluso	Neg	?	No
AMV - Taq	Suero	99-181	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	4	0.762	Probable	Pos	15	No
AMV - Taq	Suero	99-181	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	4	0.762	Probable	Pos	15	No
AMV - Taq	Suero	99-190	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Neg	3	0.052	Inconcluso	Neg	21	No
AMV - Taq	Suero	99-190	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Neg	3	0.052	Inconcluso	Neg	21	No
AMV - Taq	Sobrenadante	D1 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D1 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D2 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D2 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D3 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D3 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D4 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Nested	Pos						
AMV - Taq	Sobrenadante	D4 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Universal	Pos						
rTth	Suero	00-010	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	0.431	Probable	Pos	8	No
rTth	Suero	00-031	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	1.521	Probable	Pos	10	No
rTth	Suero	00-162	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	6	3.263	Probable	Pos	5	No
rTth	Suero	00-304	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.531	Probable	Pos	9	No
rTth	Suero	00-332	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	0.479	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	00-342	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	6	0.731	Probable	Pos	14	No
rTth	Suero	00-347	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	1.967	Probable	Pos	9	No
rTth	Suero	00-399	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	1.020	Probable	Pos	28	No
rTth	Suero	00-494	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	1.194	Probable	Pos	9	Si
rTth	Suero	01-028	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	0	0.120	Inconcluso	Neg	17	Si
rTth	Suero	01-212	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	2	0.026	Inconcluso	Neg	8	Si
rTth	Suero	98-023	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	1.516	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	98-024	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	1.514	Probable	Pos	8	No

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
rTth	Suero	98-120	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	2.989	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	98-149	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.730	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	99-181	Neg	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.762	Probable	Pos	15	No
rTth	Suero	00-114	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.073	Inconcluso	Neg	4	Si
rTth	Suero	00-167	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	1	0.580	Probable	Pos	14	No
rTth	Suero	00-179	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	6	2.307	Probable	Pos	2	No
rTth	Suero	01-068	No	0	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	0	0.039	Inconcluso	Neg	9	Si
rTth	Suero	00-000	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	1.350	Probable	Pos	0	No
rTth	Suero	00-058	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.031	Inconcluso	Neg	?	No
rTth	Suero	00-163	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.154	Inconcluso	Neg	4	No
rTth	Suero	00-325	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	1.040	Probable	Pos	3	No
rTth	Suero	00-357	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.905	Probable	Pos	6	No
rTth	Suero	00-414	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.653	Probable	Pos	?	?
	Suero	00-557	Pos	2			No	3	1.000	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	01-035	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.272	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Suero	01-045	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	1.712	Probable	Pos	2	No
rTth	Suero	01-047	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.000	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Suero	01-072	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	1.695	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	01-107	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.020	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Suero	01-142	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	4	0.082	Inconcluso	Neg	4	No
rTth	Suero	01-154	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	2	0.316	Probable	Pos	1	No
rTth	Suero	01-163	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.874	Probable	Pos	6	No
rTth	Suero	01-168	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	2	0.086	Inconcluso	Neg	1	No
	Suero	01-227	Pos	3			No	1	0.249	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Suero	01-270	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	0.214	Inconcluso	Neg	5	No
rTth	Suero	01-308	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	2.288	Probable	Pos	2	?
	Suero	01-320	Pos	4			No	5	1.509	Probable	Pos	?	?
	Suero	01-324	Pos	4			No	1	0.112	Inconcluso	Neg	?	?
	Suero	01-330	Pos	2			No	4	0.450	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	02-084	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.020	Inconcluso	Neg	5	No
rTth	Suero	02-095	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	3	?	Probable	Pos	1	?
rTth	Suero	02-124	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	?	Probable	Pos	5	No
rTth	Suero	02-132	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	1	?	Probable	Pos	7	No
rTth	Suero	02-135	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	1	1.07	Probable	Pos	7	No
	Suero	98-108	Pos	1			No	4	0.258	Inconcluso	Neg	?	?
	Suero	98-121	Pos	1			No	3	0.998	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	98-128	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	0.012	Inconcluso	Neg	?	?
	Suero	98-187	Pos	1			No	4	1.092	Probable	Pos	?	?
rTth	Suero	98-197	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	1.040	Probable	Pos	6	No
	Suero	98-218	Pos	2			No	4	0.270	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Suero	98-224	Pos	1	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.218	Inconcluso	Neg	4	No
rTth	Suero	99-005	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	0.145	Inconcluso	Neg	?	No

Enzimas	Tipo muestra	Cód. Suero	Aisl. viral	Serotipo	Mét. Extracción	Tipo Ensayo	PCR	Día Colecta	IgM D.O.	Dx. Serológ.	Result. IgM	Días de Almacen.	Caso Fatal
	Suero	99-033	Pos	1			No	5	1.015	Probable	Pos	?	?
rTth	Sobrenadante	00-163	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.154	Inconcluso	Neg	4	No
rTth	Sobrenadante	00-357	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.905	Probable	Pos	6	No
rTth	Sobrenadante	00-414	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.653	Probable	Pos	?	?
rTth	Sobrenadante	01-035	Pos	4	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	4	0.272	Inconcluso	Neg	?	?
rTth	Sobrenadante	01-072	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Neg	5	1.695	Probable	Pos	?	?
rTth	Sobrenadante	01-142	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	4	0.082	Inconcluso	Neg	4	No
rTth	Sobrenadante	01-163	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.874	Probable	Pos	6	No
rTth	Sobrenadante	01-168	Pos	3	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	2	0.086	Inconcluso	Neg	1	No
rTth	Sobrenadante	01-270	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.214	Inconcluso	Neg	5	No
rTth	Sobrenadante	98-045	Pos	2	GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos	3	0.025	Inconcluso	Neg	7	No
rTth	Sobrenadante	D1 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos						
rTth	Sobrenadante	D2 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos						
rTth	Sobrenadante	D3 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos						
rTth	Sobrenadante	D4 Ref			GuSCN-Fenol/Clorof.	Multiprimer	Pos						

ANEXO 2

Sueros con aislamiento viral positivo y negativo relacionados con los ensayos RT-PCR practicados.

Aisl. viral	Cód. Suero	AMV - Taq		Total AMV - Taq	rTth	Total rTth	Total general
		Universal	Nested		Multiprimer		
Neg	00-010	1	1	2	1	1	3
	00-031	1	1	2	1	1	3
	00-050	1	1	2	0	0	2
	00-159	1	1	2	0	0	2
	00-162	1	1	2	1	1	3
	00-187	1	1	2	0	0	2
	00-192	1	1	2	0	0	2
	00-204	1	1	2	0	0	2
	00-258	1	1	2	0	0	2
	00-268	1	1	2	0	0	2
	00-273	1	1	2	0	0	2
	00-285	1	1	2	0	0	2
	00-304	1	1	2	1	1	3
	00-308	1	1	2	0	0	2
	00-322	1	1	2	0	0	2
	00-332	1	1	2	1	1	3
	00-342	1	1	2	1	1	3
	00-345	1	1	2	0	0	2
	00-346	1	1	2	0	0	2
	00-347	1	1	2	1	1	3
	00-348	1	1	2	0	0	2
	00-349	1	1	2	0	0	2
	00-399	1	1	2	1	1	3
	00-430	1	1	2	0	0	2
	00-494	1	1	2	1	1	3
	01-001	1	1	2	0	0	2
	01-028	1	1	2	1	1	3
	01-113	1	1	2	0	0	2
	01-129	1	1	2	0	0	2
	01-212	1	1	2	1	1	3
	01-355	1	1	2	0	0	2
	02-007	1	1	2	0	0	2
	02-011	1	1	2	0	0	2
	02-148	1	1	2	0	0	2
	02-251	1	1	2	0	0	2
	02-261	1	1	2	0	0	2
	02-262	1	1	2	0	0	2
	02-263	1	1	2	0	0	2
	02-264	1	1	2	0	0	2
	02-265	1	1	2	0	0	2
	02-266	1	1	2	0	0	2
	02-268	1	1	2	0	0	2
02-270	1	1	2	0	0	2	

Aisl. viral	Cód. Suero	AMV - Taq		Total AMV - Taq	rTth	Total rTth	Total general
		Universal	Nested		Multiprimer		
	02-272	1	1	2	0	0	2
	02-273	1	1	2	0	0	2
	02-274	1	1	2	0	0	2
	02-275	1	1	2	0	0	2
	02-276	1	1	2	0	0	2
	02-291	1	1	2	0	0	2
	02-365	1	1	2	0	0	2
	02-366	1	1	2	0	0	2
	02-368	1	1	2	0	0	2
	02-369	1	1	2	0	0	2
	02-374	1	1	2	0	0	2
	98-023	1	1	2	1	1	3
	98-024	1	1	2	1	1	3
	98-120	1	1	2	1	1	3
	98-149	1	1	2	1	1	3
	98-193	1	1	2	0	0	2
	99-181	1	1	2	1	1	3
Total Neg		60	60	120	16	16	136
Pos	00-000	0	0	0	1	1	1
	00-058	0	0	0	1	1	1
	00-163	1	1	2	1	1	3
	00-325	1	1	2	1	1	3
	00-357	1	1	2	1	1	3
	00-414	1	1	2	1	1	3
	01-035	0	0	0	1	1	1
	01-045	1	1	2	1	1	3
	01-047	1	1	2	1	1	3
	01-072	1	1	2	1	1	3
	01-107	1	1	2	1	1	3
	01-142	1	1	2	1	1	3
	01-154	1	1	2	1	1	3
	01-163	1	1	2	1	1	3
	01-168	1	1	2	1	1	3
	01-270	1	1	2	1	1	3
	01-308	1	1	2	1	1	3
	02-084	1	1	2	1	1	3
	02-092	1	1	2	0	0	2
	02-095	1	1	2	1	1	3
	02-107	1	0	1	0	0	1
	02-124	1	1	2	1	1	3
	02-132	1	1	2	1	1	3
	02-135	1	0	1	1	1	2
	02-288	1	1	2	0	0	2
	02-310	1	1	2	0	0	2
	02-311	1	1	2	0	0	2
	02-317	1	1	2	0	0	2
	98-020	0	0	0	0	0	0
	98-045	1	1	2	0	0	2
	98-128	0	0	0	1	1	1
	98-158	0	0	0	0	0	0
	98-197	1	1	2	1	1	3
	98-205	0	0	0	0	0	0
	98-224	0	0	0	1	1	1
	99-005	1	0	1	1	1	2
Total Pos		28	25	53	26	26	79
Total general		88	85	173	42	42	215