

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**“PROPUESTA DE IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA RT-
qPCR PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR TEMPRANA DEL
VIRUS DENGUE EN EL LABORATORIO REFERENCIAL DE
SALUD PÚBLICA – DIRESA JUNÍN”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

DAVID EDUARDO SEVERO ROMERO

ASESOR(ES):

MG. DENIS HELAN CASTILLO PAREJA

LIMA – PERÚ

2022

MIEMBROS DEL JURADO

PRIMER REVISOR

Mg. Mariano Giovanni López Campana

SEGUNDO REVISOR

Mg. Michael John Talledo Albújar

DEDICATORIA

A mis amados padres David y Rosa por ser un ejemplo y soporte diario. Mi agradecimiento es infinito, sin ustedes nada de esto sería posible.

A mi hermana Violeta por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir.

A Alejandra, por ser mi apoyo y soporte durante la etapa de pregrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Blgo. Omar Orellana y a la Blga. Alexandra Ramos por su apoyo y motivación para desarrollar el presente trabajo en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

A mi asesor Mg. Denis Castillo por su guía y consejos durante la elaboración de todo este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo y buena disposición ante mis dudas y consultas.

RESUMEN

El dengue es una enfermedad producida por el virus del dengue. En la actualidad existen diversas técnicas que son utilizadas para su diagnóstico, sin embargo, la RT-qPCR permite obtener resultados confiables y rápidos con una alta sensibilidad y especificidad. Además, a diferencia de la prueba ELISA NS1, nos permite identificar los serotipos del DENV. El objetivo del presente Trabajo de Suficiencia Profesional fue diseñar una propuesta para la implementación de la técnica RT-qPCR para la detección molecular temprana del DENV y sus serotipos en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

Se revisó la bibliografía disponible sobre los *primers* y las sondas que están siendo utilizados para el diagnóstico del DENV y sus serotipos. Estas secuencias fueron evaluadas mediante la herramienta “Nucleotide-BLAST” y en base a los resultados obtenidos se propusieron los *primers forward* GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT, *reverse* TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC y *forward* AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA, *reverse* TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC para su uso en el diagnóstico de los serotipos DENV-1 y DENV-2 respectivamente. Se elaboró el protocolo para la estandarización de la técnica RT-qPCR y las condiciones mínimas para su operación fueron elaboradas en base a la infraestructura y equipos disponibles en el laboratorio. Los pasos para desarrollar cada actividad se establecieron en los protocolos de recepción de muestras, alicuotado, extracción de ARN viral y RT-qPCR. Finalmente se compararon los resultados de las pruebas ELISA NS1 procesadas en el Laboratorio referencial y los resultados de la RT-qPCR reportados en el sistema NETLAB durante el periodo comprendido entre septiembre 2018 y agosto 2021. Los

resultados de la RT-qPCR han demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad en comparación de los resultados de la técnica de ELISA NS1. Estos hallazgos demostraron la importancia de la implementación de la RT-qPCR como herramienta de diagnóstico molecular del DENV y sus serotipos en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

Palabras clave: Virus del Dengue, RT-qPCR, control de calidad.

ABSTRACT

Dengue fever is a disease caused by the dengue virus (DENV). In actuality there are several techniques that are used for its diagnosis. The RT-qPCR test enables reliable results with high sensitivity and specificity, moreover unlike the ELISA NS1 test, it allows us to identify the serotypes of DENV. The objective of the current work was to design a proposal for the implementation of the RT-qPCR for their use as an early molecular detection test of DENV and its serotypes in the Public Health Reference Laboratory – DIRESA JUNÍN.

The available bibliography on the primers and probes that are being used for the diagnosis and identification of DENV and its serotypes was reviewed. These sequences were evaluated using the “Nucleotide-BLAST” tool and based on the results the primer sequences forward GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT, reverse TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC and forward AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA, reverse TGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC were proposed for the diagnosis of DENV-1 and DENV-2 respectively. The protocol for the standardization of the RT-qPCR test and the minimum conditions for its operation was elaborated and based on the infrastructure and equipment available in the laboratory. The steps to perform each activity were established in the protocols for receiving samples, aliquoting samples, extraction of viral RNA and the RT-qPCR test. Finally, a comparison was made between the results of the ELISA NS1 processed in the Reference Laboratory and the results of the RT-qPCR test reported on the NETLAB system during the period between September 2018 and August 2021. The results of the RT-qPCR have been shown to have higher sensitivity and specificity compared to the results of the ELISA NS1 test. These findings

demonstrated the importance of the implementation of the RT-qPCR test as a molecular diagnostic tool for DENV and its serotypes in the Public Health Reference Laboratory – DIRESA JUNÍN.

Keywords: Dengue virus, RT-qPCR, quality control.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Epidemiología	2
I.3. Medidas de prevención y control	3
I.4. Costo económico	4
I.5. Transmisión	5
I.6. Estructura del DENV	6
I.7. Genómica del DENV	7
I.8. Ciclo replicativo del DENV	9
I.8.1. Dentro del vector	9
I.8.2. Dentro del huésped	9
I.9. Manifestaciones clínicas	11
I.10. Diagnóstico	12
I.10.1. Aislamiento viral	13
I.10.2. Pruebas rápidas	14
I.10.3. ELISA	14
I.10.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
I.11. ELISA NS1 vs RT-qPCR	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. OBJETIVOS	25
IV.1. Objetivo principal:	25
IV.2. Objetivos específicos:	25
V. METODOLOGÍA	25
V.1. Propuesta de una secuencia de <i>primers</i> y sondas para la detección del virus del dengue y sus serotipos	25
V.2. Determinación de los criterios de estandarización de la prueba RT-qPCR	27
V.3. Determinación de las condiciones mínimas de operación de las pruebas RT-qPCR	28
V.4. Propuesta de los criterios que aseguren la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR	28

V.5. Evaluación de los resultados de las pruebas de ELISA y de RT-qPCR previamente reportados en el sistema NETLAB.	29
V.5.1. Evaluación de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y Odds ratio de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR	30
V.5.2. Evaluación de los resultados de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR mediante el Test de diagnósticos binarios.....	31
VI. RESULTADOS	31
VI.1. Evaluación de los <i>primers</i> y las sondas encontradas en la bibliografía	31
VI.1.1. Propuesta de <i>primers</i>	32
VI.1.2. Propuesta de sondas.....	34
VI.2. Parámetros para la estandarización de la prueba RT-qPCR.	35
VI.3. Determinar las condiciones mínimas de operación de las pruebas RT-qPCR....	37
VI.4. Determinación de los criterios que aseguren la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR.	40
VI.4.1. Parámetros del control de calidad de las muestras	40
VI.4.2. Parámetros del control de calidad de los procesos	41
VI.5. Evaluación de los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y de RT-qPCR previamente reportados en el sistema NETLAB.....	42
VI.5.1. Resultados de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR	42
VI.5.2. Cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y odds ratio.....	48
VI.5.3. Cálculo de la sensibilidad y especificidad mediante el Test de diagnósticos binarios.	49
VII. DISCUSIÓN	49
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. RECOMENDACIONES.....	58
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
XI. ANEXOS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADE	Aumento dependiente de anticuerpos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BLAST	Basic local alignment search tool
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DENV	Virus del dengue
DENV – 1	Serotipo N° 1 del virus del dengue
DENV – 2	Serotipo N° 2 del virus del dengue
DENV – 3	Serotipo N° 3 del virus del dengue
DENV – 4	Serotipo N° 4 del virus del dengue
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earles
FRET	Transferencia de energía de resonancia
FDH	Fiebre del dengue hemorrágico
INS	Instituto Nacional de Salud
MM	Medio de mantenimiento
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NS	Proteínas no estructurales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RdRP	Polimerasa dependiente de ARN
RT	Trascrición inversa o retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real
SSD	Síndrome de shock por dengue
UTR	Regiones no traducidas
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01: *Aedes aegypti* hembra alimentándose
- Figura 02: Estructura del DENV
- Figura 03: Genoma del DENV
- Figura 04: Ciclo de vida del DENV dentro de las células huésped
- Figura 05: Sensibilidad relativa de las pruebas de diagnóstico de dengue
- Figura 06. Cinética de la amplificación de la qPCR
- Figura 07: Vista de los resultados de la página “Nucleotide-BLAST”
- Figura 08: Esquema del proceso para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio referencial

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 01: Documento de aceptación de la DIRESA - JUNÍN
- Anexo 02: Resultados del análisis de las secuencias de primers mediante la herramienta BLAST.
- Anexo 03: Resultado del análisis de las secuencias de sondas TaqMan® mediante la herramienta BLAST
- Anexo 04: Protocolo de estandarización del procedimiento para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR
- Anexo 05: Protocolo de recepción y codificación de muestras
- Anexo 06: Protocolo de alicuotado de muestras
- Anexo 07: Protocolo de extracción de ARN viral.
- Anexo 08: Protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue.
- Anexo 09: Ficha epidemiológica
- Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1
- Anexo 11: Programación del Test de diagnósticos binarios en el programa R Statistics©
- Anexo 12: Preparación de soluciones utilizadas para la limpieza y desinfección de superficies.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 01: Comparación de la sensibilidad y especificidad entre kits ELISA NS1.
- Tabla 02: Tabla comparativa de las técnicas ELISA NS1 y RT-qPCR para el diagnóstico de dengue.
- Tabla 03: Secuencias de *primers* propuestas para el diagnóstico de dengue
- Tabla 04: Secuencias de sondas TaqMan® propuestas para el diagnóstico de dengue
- Tabla 05: Parámetros para la estandarización de la prueba RT-qPCR
- Tabla 06: Condiciones mínimas requeridas para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR en el Laboratorio referencial.
- Tabla 07: Parámetros de control de calidad de los controles.
- Tabla 08: Criterios para el control de calidad de los procesos.
- Tabla 09: Número de muestras con sospecha de dengue procesadas mediante la técnica ELISA NS1 durante el periodo de septiembre del 2018 a agosto del 2021.
- Tabla 10: Tabla de frecuencias de los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y RT-qPCR.
- Tabla 11: Tabla de frecuencias de los serotipos encontrados en las pruebas positivas.
- Tabla 12: Sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y odds ratio.
- Tabla 13: Programación de los ciclos en el equipo de q PCR
- Tabla 14: Criterios de validación de los controles en la técnica RT-qPCR

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades

La enfermedad del dengue o también conocida antiguamente como la “fiebre quebranta huesos”, viene infectando a millones de personas desde hace más de 400 años. Es ocasionada por el virus del dengue (DENV) perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Posee cuatro serotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Las diferencias entre los serotipos son pocas, comparten las mismas manifestaciones clínicas y mecanismos de transmisión (1).

Esta enfermedad es la arbovirosis (su ciclo incluye animales vertebrados y artrópodos) más extendida a nivel mundial y la más rápida propagándose. Se conoce que el dengue está presente en varios países que albergan aproximadamente a la mitad de la población mundial, sin embargo, se estima que el área potencialmente endémica es mayor pues la presencia de infecciones no reportadas y no reconocidas, debido a que la mayoría de los casos son asintomáticos, dificultan su extensión real.

Los brotes de dengue son cíclicos y estacionales, se presentan cada tres o cinco años y dependen principalmente de las condiciones climáticas de la zona como la temperatura, las precipitaciones y la humedad. Cuando se presenta un brote, estos son explosivos y de rápida propagación. En las zonas donde esta enfermedad es endémica los mayores casos se presentan principalmente en niños y en turistas. Cuando se presenta un brote en zonas donde esta enfermedad no es común, puede llegar a afectar hasta al 70% u 80% de la población (2).

El dengue es una enfermedad febril que no tiene un tratamiento específico, solo se utilizan medidas paliativas o de soporte para contrarrestar los síntomas que pudieran presentarse mientras dura su periodo de infección (3).

I.2. Epidemiología

La incidencia de esta enfermedad a nivel mundial es alta. Según la OMS, se estima que cada año se producen 390 millones de infecciones de las cuales solo una cuarta parte presentan síntomas, 500 000 casos son graves y unas 25 000 personas contagiadas mueren (4). En el año 2019 se reportó en el continente americano 3.1 millones de casos, de los cuales más de 28 000 fueron graves y 1 535 pacientes fallecieron (5). En el Perú se estima que hay entre 751 a 1000 casos de dengue por cada 100 000 habitantes (6). Entre los años 2015 y 2021, la incidencia de la enfermedad no ha sido constante. El 2017 fue el año con más contagios, donde se reportaron 68 290 casos y 89 muertes, probablemente inducido por la presencia del “Fenómeno de El Niño costero”, mientras que en el 2019 se reportaron 15 290 casos y 37 muertes. A la fecha (semana epidemiológica 38 del 2021), en el país han sido reportados 35 995 contagios y 27 muertes. Para el departamento de Junín, el año con menos casos reportados fue el 2018 con 51 casos, mientras que el año 2020 se reportaron 3738 casos y para la semana epidemiológica 38 del año 2021 ya se han reportado 3213 casos de dengue, siendo Perene, Pangoa, Chanchamayo y Pichanaki los distritos con mayor incidencia de esta enfermedad (7).

El incremento de la población y el aumento desmedido de la urbanización sin una planificación previa en zonas donde las arbovirosis son endémicas, ha traído como consecuencia que una mayor cantidad de personas esté expuesta a estas enfermedades, incluyendo al dengue. Además, si consideramos el aumento de la temperatura producto

del cambio climático se estima que para el año 2100 el número de personas expuestas a esta enfermedad se duplicará (8).

I.3. Medidas de prevención y control

Si bien el dengue es la arbovirosis que se propaga con mayor rapidez, se pueden tomar medidas que mitiguen los brotes explosivos. Ante la ausencia de una vacuna que sea aprobada para su uso generalizado, la prevención de la transmisión del dengue se centra en las políticas de control de vectores como destruir las zonas donde se pueda replicar el mosquito (9). Uno de los grandes problemas para controlar los brotes de dengue se debe a la transmisión vertical del virus (10), la cual garantiza que el virus persista sin necesidad de que el mosquito se alimente de un huésped infectado. Para contrarrestar esto, las instituciones responsables llevan a cabo programas de control de vectores, como campañas de fumigación con larvicidas e insecticidas en los hogares para eliminar las larvas y los mosquitos adultos. Las campañas de sensibilización sobre el uso de repelentes, protección de los contenedores de agua, eliminación del agua estancada y la reducción de residuos sólidos son importantes para evitar atraer a los mosquitos y reducir su reproducción (11).

No todos los factores que fomentan la propagación del dengue pueden ser controlados como las condiciones climáticas y hasta cierto punto, los aspectos sociales como el incremento de la población o la expansión urbana sin planificación. Sin embargo, la implementación de técnicas de diagnóstico más sensibles contribuiría con brindar información fiable que permita a las autoridades responsables de elaborar estas estrategias de control y desarrollar medidas más eficaces para mitigar el progreso de los posibles brotes de esta enfermedad (12).

I.4. Costo económico

El costo económico que representa para los gobiernos combatir las enfermedades transmitidas por vectores es considerable. Dentro de los costos de la enfermedad se tienen que considerar las actividades y estrategias que se desarrollan para el control del vector, las campañas de concientización, la atención en los centros de salud y su tratamiento, la disminución de la productividad laboral producto de la ausencia al centro de trabajo o en las actividades económicas que sustentan a las familias de los pacientes en los periodos de enfermedad (13). Además, también representa un gasto para los pacientes y sus familias debido a que tienen que implementar medidas de protección individual como la instalación de mosquiteros o uso de repelentes.

Debido a la mayoría de casos de dengue son asintomáticos, no son diferenciados de otras enfermedades o simplemente no son reportados, por lo tanto, es difícil elaborar una estimación sobre su impacto económico real y cuanto es el costo por cada caso. El costo estimado que representaba el dengue a nivel mundial era de 89 000 millones de dólares y el costo promedio por cada caso era de 70 dólares, cifras elevadas en comparación con el impacto que generan otras enfermedades como Chagas, Rotavirus, Cólera y Rabia (6). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los costos son circunstanciales, las decisiones que son determinadas para su control influyen de forma significativa en la reducción o aumento de su impacto económico. Los gobiernos deben preocuparse más en invertir en nuevas tecnologías de diagnóstico para que contribuyan a los responsables de elaborar las estrategias de control en tomar decisiones acertadas que permitan la reducción de los casos de esta enfermedad.

I.5. Transmisión

El DENV es transmitido por un mosquito perteneciente a la orden *Díptera*, familia *Culicidae*, género *Aedes* cuya especie principal es *Aedes aegypti* (figura 01). Se encuentra presente en las zonas donde esta enfermedad es endémica como en nuestro país. Se caracterizan por tener un par de ojos compuestos en una cabeza de forma esférica, con una probóscide que perfora los tejidos cutáneos y es lo suficientemente larga para alcanzar un capilar.



Figura 01: *Aedes aegypti* hembra alimentándose.

Tomado de Restrepo y Botero, 2019:1175 (16)

A. aegypti sirve como vector y reservorio para que el virus sea transportado y transmitido mediante su picadura de una persona enferma hacia una persona sana. Otra vía de transmisión poco frecuente se presenta de forma vertical o mediante trasplante de órganos. Este mosquito no solo es vector del dengue, también es vector de otras arbovirosis como la Fiebre amarilla urbana, Chikungunya y Zika (14).

Aedes aegypti posee una estrecha relación con los seres humanos. Se ha adaptado a vivir en las zonas urbanas y se reproducen en contenedores con residuos de agua sin protección, donde la hembra deposita sus huevos. Se estima que en las zonas endémicas, una de cada veinte casas puede albergar un mosquito con la presencia de este virus (1). Una vez que

el mosquito se vuelve infeccioso, puede propagar y transmitir el virus durante todo su periodo de vida, el cual puede variar entre una y cuatro semanas dependiendo de las condiciones climáticas y el acceso a fuentes nutritivas. Dentro de su ciclo de vida posee cuatro etapas: huevos, larvas, pupas y adultos (15). La temperatura ambiental favorece a que el periodo larvario del vector sea más corto, provocando un mayor número de mosquitos adultos en una menor cantidad de días (8). Los mosquitos machos por lo general se alimentan de néctar de plantas pero las hembras son las hematófagas, ya que este alimento les brinda las suficientes proteínas para la formación de huevos (16). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de machos infectados, por la transmisión vertical del virus por parte de una hembra infectada que transmite el virus a su progenie (huevos y pupas) (10).

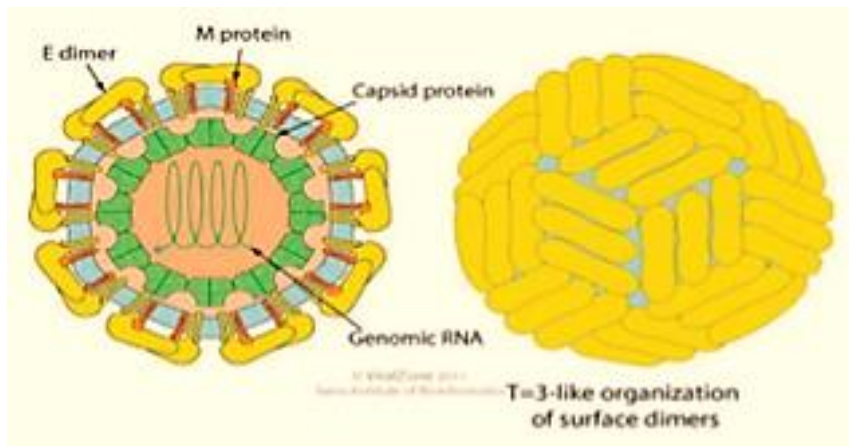


Figura 02: Estructura del DENV

Tomado y adaptado de Das G, Ghosal, S y Mohanty, S, 2019:11 (17)

I.6. Estructura del DENV

El DENV es un virus icosaédrico de ARN de aproximadamente 50 nm de diámetro. Su estructura exterior está conformada por una capa lipídica donde se encuentran las

proteínas de membrana y envoltura. La estructura interior está conformada por la proteína de la cápside donde se encuentra la cadena simple de ARN de sentido positivo de aproximadamente 11 kb que codifica una única poliproteína (Figura 02).

I.7. Genómica del DENV

Actualmente se ha reportado que existen 4 serotipos del virus del dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 los cuales son serológicamente distintos, pero todos tienen un genoma de ARN de cadena simple que traduce una sola poliproteína que es dividida por proteasas para producir tres proteínas estructurales y siete no estructurales (NS) (Figura 03) (18).

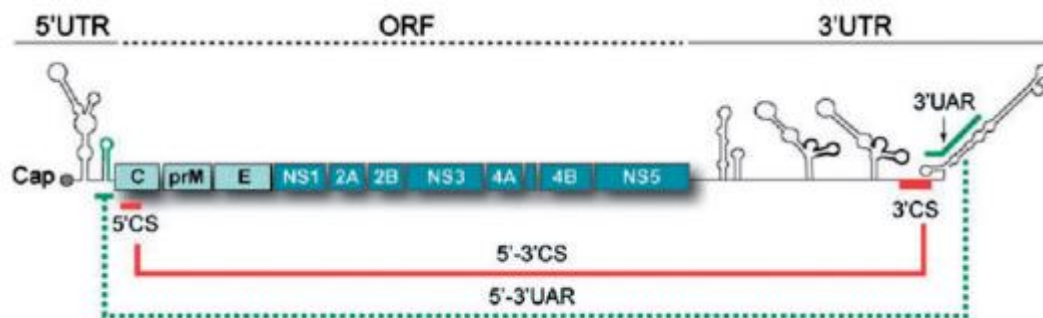


Figura 03: Genoma del DENV

Tomado y adaptado de Dwivedi V, Tripathi I, Tripathi R, Bharadwaj S y Mishra S,
2017:218 (18)

Cada una de las proteínas contribuyen a la replicación del virus dentro de las células del huésped y poseen una función específica (18,19):

- **Cápside C:** Proteína importante que recubre el material genético del virus.
- **Proteína de membrana (prM/M):** Proteína importante en la maduración de los virus DENV, donde una proteasa separa los péptidos pr y M.

- **Proteína de envoltura E:** Proteína que recubre a todo el virus y su función principal es ser la responsable de la unión del virus con las células del huésped. La proteína E difiere en las cepas patógenas y no patógenas del DENV, debido a que los anticuerpos que pueden contrarrestar a un serotipo, son ineficaces con otro serotipo. Esto hace que el gen E sea considerado como un marcador de la patogenicidad del virus.
- **NS1:** Proteína no estructural esencial para la replicación del genoma del virus y su viabilidad, sin embargo, no tiene actividad biológica y tampoco se le ha asignado una función definida. Estimula la respuesta humoral del huésped (20).
- **NS2a:** Proteína no estructural que forma parte importante del complejo de replicación viral, que contrarresta la respuesta inmune y participa en el ensamblaje del virión. Está presente en la mayoría de *flavovirus*.
- **NS2b:** Forma un complejo con la proteína NS3 para dividir la poliproteína, lo cual la hace objetivo de posibles fármacos antivirales contra los serotipos de DENV.
- **NS3:** Proteína no estructural involucrada en la replicación, protegiendo la cadena de ARN. Funciona también como helicasa y NTPasa.
- **NS4a y NS4b:** Contribuyen en la replicación del DENV y en las interacciones del virus con las células del huésped.
- **NS5:** Proteína no estructural más grande compartida por los *Flavivirus*. Uno de sus dominios es el encargado de proteger la cadena de ARN, para que no sea degradado y sea replicado en más poliproteínas por las células del huésped.

Los extremos 5' y 3' contienen regiones no traducidas (UTRs) que son importantes para la replicación y traducción del virus (18).

- **Extremo 5' UTR:** Tiene una longitud de entre 95 y 101 nucleótidos que contiene dos dominios con diferentes funciones en la replicación del genoma. El primero (aproximadamente 70 nucleótidos) es el promotor para la polimerasa dependiente de

ARN (RdRP). El segundo dominio posee patrones de secuencia para la unión ARN-ARN y la duplicación de ARN.

- **Extremo 3' UTR:** Tiene una longitud de aproximadamente 450 nucleótidos que contiene tres dominios. El primero varía de entre 120 a 150 nucleótidos dependiendo del serotipo de DENV y se encuentra junto al codón de terminación. El segundo dominio posee dos secuencias que están presentes en todos los *flavivirus* transmitidos por vectores. El tercer dominio posee patrones de secuencia importantes para la unión ARN-ARN entre los extremos del genoma.

I.8. Ciclo replicativo del DENV

I.8.1. Dentro del vector

Una vez que se produce la picadura del mosquito hembra a una persona infectada, el periodo de incubación dentro del vector se produce entre las dos semanas siguientes, donde la replicación del virus se produce en el intestino medio antes de dispersarse hacia las glándulas salivales. El periodo de tiempo que transcurre desde que el mosquito ha adquirido al virus y es transmitido hacia una persona sana es conocido como periodo de incubación extrínseco (2).

I.8.2. Dentro del huésped

El DENV se une a la célula del huésped cuando la proteína E del virus se adhiere a la proteína receptora, lo que le permite ingresar mediante endocitosis mediada por el receptor. Una vez que el virus se encuentra dentro de la célula es transportado por un endosoma, se fusiona con su membrana y libera su material genético en el citoplasma. El ARN viral puede servir como cadena molde para producir nuevas copias del genoma o

ingresa al retículo endoplasmático rugoso para que los ribosomas de la célula huésped traduzcan el ARNm en una sola poliproteína (18,19). Dentro del retículo endoplasmático rugoso las proteasas dividen la poliproteína en tres proteínas estructurales y siete proteínas NS. La replicación ocurre en las vesículas de membrana inducidas por el complejo de replicación del virus, donde las cadenas con sentido negativo sirven como molde para crear nuevas copias de sentido positivo. Las nuevas cadenas son empaquetadas por la proteína C, adquieren una bicapa lipídica (proteínas E y prM) y luego son transportadas hacia el aparato de Golgi. Las proteasas cortan el péptido prM, y son liberados de la célula huésped como viriones maduros por exocitosis. Si no se elimina el péptido prM, los virus son inmaduros o parcialmente maduros (figura 04) (19,21).

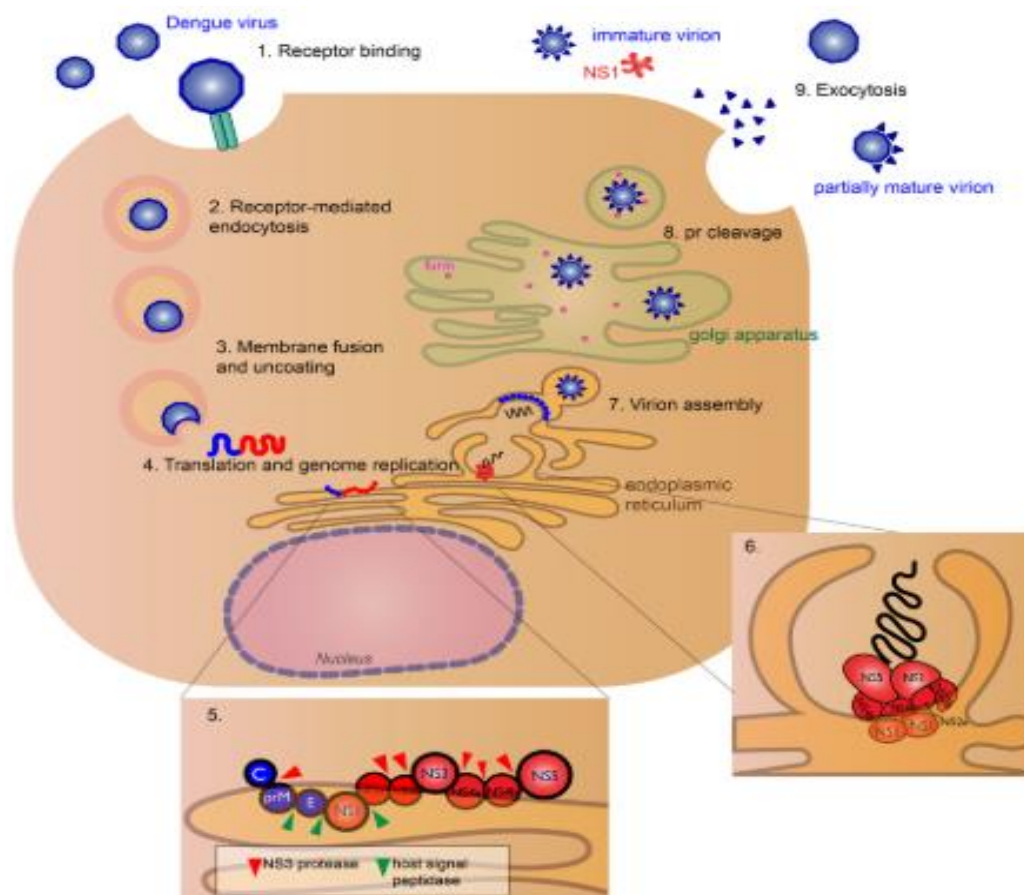


Figura 04: Ciclo de vida del DENV dentro de las células huésped

Tomado de Uno y Ross, 2018:3 (21)

I.9. Manifestaciones clínicas

La OMS clasifica al dengue en dos categorías: dengue con o sin signos de alerta y dengue grave (22), aunque tradicionalmente la clasificación se ha centrado en diferenciar al dengue clásico o leve y al dengue grave que incluye la fiebre de dengue hemorrágico (FDH) y el síndrome de shock por dengue (SSD). Luego de la picadura del mosquito, el virus se replica en los ganglios linfáticos y luego se propaga por el torrente sanguíneo hacia otros tejidos (3). Los síntomas de la enfermedad pueden ser variados, pasando desde los casos que son asintomáticos a casos graves como la causada por la FDH que puede ocasionar la muerte del paciente. El inicio de los síntomas está directamente relacionado con la carga viral, si esta es alta, los síntomas se presentarán más rápido y si es baja, los síntomas se demorarán en presentarse o en muchos casos no se presentarán (19).

Los casos graves se presentan debido a un particular fenómeno inmunológico de aumento dependiente de anticuerpos o ADE por sus siglas en inglés. Los anticuerpos generados en la primera infección por un serotipo pueden unirse a otro serotipo durante una segunda infección pero no lo neutralizan, incrementando el riesgo de sufrir un cuadro clínico grave (23). La infección primaria genera una inmunidad parcial y probablemente de por vida contra el serotipo que ha causado la infección, sin embargo, como existen cuatro serotipos, una persona de las zonas endémicas podría infectarse con cada uno a lo largo de su vida (24). Durante la segunda infección los anticuerpos no neutralizantes de la reacción cruzada facilitan la entrada de los inmunocomplejos (complejo virus – anticuerpo) no neutralizados en las células fagocíticas mononucleares. Esto ocasiona que más células del huésped sean infectadas (ADE extrínseco) o una menor respuesta por parte de los linfocitos TH2 (ADE intrínseco) del virus a las células desencadenando reacciones antiinflamatorias más fuertes. Los fagocitos mononucleares infectados sirven

como reservorio del virus ayudándolo a que pueda diseminarse a diferentes tejidos provocando una infección más extendida y con mayor carga viral, lo cual eleva la posibilidad de que se produzca un dengue grave. Este fenómeno inmunológico también puede presentarse en niños recién nacidos cuyas madres han tenido la enfermedad antes de dar a luz, en personas que hayan tenido una primera infección provocada por otro *flavivirus* (23,25) o por una coinfección simultánea de diferentes serotipos (26).

El diagnóstico clínico del dengue es complicado, debido a que los síntomas del dengue pueden confundirse con otras enfermedades como el Zika, Chikungunya, Fiebre amarilla (enfermedades con las que comparte el mismo vector), Influenza, COVID-19, Malaria, Leptospirosis, Rickettsia, Rubeola, Sarampión, Fiebre tifoidea, Leucemia, Hepatitis u otras enfermedades que produzcan fiebre hemorrágica, por lo que diferenciarlos puede ser difícil, lo cual provoca que los diagnósticos presuntivos no sean claros (22).

I.10. Diagnóstico

Es importante tener en cuenta que, para sospechar de un caso de dengue, los síntomas se deben presentar en individuos que habitan en las áreas endémicas o en personas que hayan visitado estas zonas recientemente (27,28). La enfermedad y sus variantes puede ser diagnosticada en una muestra de sangre obtenida del paciente sospechoso mediante la detección del ácido nucleico viral, pruebas rápidas que detectan la presencia de la proteína NS1 (principal responsable de la replicación del virus), antígenos virales o aislando el virus a partir de leucocitos sanguíneos o del suero (29). Los métodos utilizados para su diagnóstico pueden variar dependiendo del inicio de los síntomas (Figura 05) y la situación actual del paciente al momento de ir al centro de salud para atenderse (30). Entre los métodos de diagnóstico tenemos:

I.10.1. Aislamiento viral

Esta técnica de diagnóstico nos permite cultivar al DENV a partir de una muestra de pacientes en fases agudas de la enfermedad. Existen tres métodos para el aislamiento viral: inoculación en cerebros de ratones, inoculación en mosquitos susceptibles e inoculación en células derivadas de mosquitos o mamíferos (19). Una vez que se ha aislado el DENV se identifica los antígenos o las partículas virales mediante inmunofluorescencia o microscopía electrónica.

a. Inoculación intracerebral de ratones

Es un método tradicional usado desde hace varias décadas para el diagnóstico del DENV, sin embargo, es considerada costosa y poco sensible. Consiste en la inoculación del DENV en los cerebros de ratones recién nacidos, si estos presentan síntomas como parálisis y encefalitis, se extraen las células cerebrales para el aislamiento del DENV.

b. Inoculación en mosquitos susceptibles

Es una técnica con alta sensibilidad que es utilizada preferentemente en muestras de pacientes fallecidos. Las especies de mosquitos utilizados son *Aedes albopictus* o *Toxorhynchites amboinensis* donde el DENV es aislado del intestino medio luego de una semana o de las glándulas salivales luego de doce días de haber sido inoculado el virus. Una de las principales desventajas de esta técnica es que resulta ser costosa y difícil, además de que no todos los centros de diagnóstico cuentan con un insectario que pueda proveer los mosquitos para el desarrollo de esta técnica.

c. Aislamiento en cultivos celulares

En esta técnica se utilizan líneas celulares provenientes de mosquitos (C6/36, Tra-284 y AP61) o de mamíferos (VERO, LLCMK2 y BHK21). Son utilizadas para el aislamiento de los cuatro serotipos del DENV en los que cada uno provoca un efecto citopático diferente dependiendo el tipo de célula utilizada.

I.10.2. Pruebas rápidas

En esta técnica se agrega una muestra de suero en un casete que contiene una membrana de nitrocelulosa, donde por inmunocromatografía puede detectar la presencia de los antígenos NS1, IgM o IgG del DENV. Muchos establecimientos de salud utilizan pruebas de diagnóstico rápido para la detección de pacientes sospechosos, sin embargo, estas pruebas tienen baja sensibilidad para la detección lo cual hace que se presenten muchos falsos negativos y falsos positivos (31).

I.10.3. ELISA

Dentro de los métodos inmunoenzimáticos encontramos a la prueba de inmunoadsorción enzimática o también conocida como prueba de ELISA. Esta técnica sirve para el diagnóstico cualitativo o semicuantitativo de antígenos. Para el diagnóstico de dengue los antígenos pueden ser NS1, IgM e IgG. En esta técnica, los anticuerpos están inmovilizados en las microplacas, se agrega la muestra del paciente y si detecta la presencia de antígenos se forma un complejo inmune de tipo sándwich. Posteriormente se realiza un lavado y se le añade una solución de revelación enzimática, la cual, si resulta ser positiva, se observa una reacción coloreada.

d. ELISA NS1

La prueba ELISA NS1 es una alternativa para la detección semicuantitativa de la proteína viral no estructural NS1. Es utilizada en las etapas agudas por lo que reaccionará durante los primeros días de la enfermedad (32). Sin embargo, uno de los principales problemas es que pueden presentarse falsos positivos y falsos negativos (31). Los falsos positivos se presentan principalmente debido a que pueden existir reacciones cruzadas con otras enfermedades producidas por *flavivirus* (Zika, Chikungunya o la vacuna contra la fiebre amarilla) (25,33) o reactividad no específica (34). En el caso de los falsos negativos se presentan debido a que una gran parte de los casos de dengue son asintomáticos o los síntomas son leves, generando una carga viral lo suficientemente baja que no sobrepasa los umbrales de detección o son diagnosticadas de forma errónea como otras enfermedades febriles. En el mercado existen varias marcas de kits de ELISA NS1 para la detección del DENV. Esta variedad permite que sean accesibles para su adquisición por los centros de salud y laboratorios de diagnóstico ante la presencia de posibles eventualidades como la escasez de una determinada marca, falta de stock por parte de los proveedores, precio, etc. Sin embargo, cada kit difiere en la especificidad y sensibilidad de sus resultados (Tabla 01), lo cual significa la posibilidad de que se presenten mayores discrepancias en el diagnóstico (35).

e. ELISA IgM e IgG

El procedimiento de esta técnica es similar al descrito en la prueba ELISA NS1. Las pruebas de ELISA para IgM e IgG son buenos indicadores para la detectar la infección pasada de la enfermedad, sin embargo, en etapas tempranas, estas pruebas resultan negativas. La prueba ELISA IgM tiene un periodo de mayor sensibilidad entre la primera

y cuarta semana desde el inicio de los síntomas de la enfermedad (28). Los antígenos IgG pueden permanecer dentro del paciente durante años e indican una infección aguda.

Tabla 01: Comparación de la sensibilidad y especificidad entre kits ELISA NS1

Kits comerciales ELISA NS1		IC del 95%		Muestra	Prueba comparativa	Referencia
Marca	Nombre	Sensibilidad	Especificidad			
BIO-RAD	PLATELIA™ DENGUE NS1 Ag	85.8% - 94.8%	99.4% - 100%	Suero – Plasma	RT-PCR	(36)
InBios International	DENV Detect™ NS1 ELISA	80.9% - 91.2%	95.5% -99.1%	Suero	RT-PCR	(37)
Creative diagnosis	Dengue NS1 Antigen ELISA Kit	99.21%	99.76%	Suero – Plasma	Quimioluminiscencia y otros ELISA validados	(38)
Focus diagnostics	Dengue NS1 Antigen DxSelect™	73,4% - 95,3%.	93,2 -100,0%	Suero	RT-PCR	(39)
Abbott	Panbio™ Dengue Early ELISA	77,7 % y 76 % (a)	93,6 % y 98,4 % (a)	Suero	NE	(40)
Euroimmun	Dengue Virus NS1 ELISA	99%	98%	Suero – Plasma	ELISA de otros fabricantes	(41)

(a): Estudios en dos países – Vietnam y Tailandia

NE: Información no especificada

Fuente: Elaboración propia

I.10.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

a. PCR convencional

Dentro de las técnicas moleculares tenemos a la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés. Es una herramienta que puede ser utilizada para el diagnóstico de diversos microorganismos patógenos, como el DENV. Está dividida en tres etapas: en la primera etapa conocida como pre-PCR, se lleva a cabo la extracción del ADN o ARN, la segunda etapa es la PCR propiamente dicha donde un segmento de interés es amplificado múltiples veces y en la última etapa conocida como post-PCR, los fragmentos amplificados o también conocidos como amplicones, son detectados mediante

una electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida (42). Esta técnica también permite el análisis de la transcripción inversa o retrotranscripción (RT) convirtiendo el ARNm a ADNc para luego ser amplificado mediante la PCR, ofreciendo una gran herramienta para su uso como diagnóstico de la expresión génica de transcripciones de ARN (43).

b. PCR en tiempo real (qPCR)

La técnica de PCR en tiempo real (qPCR) no necesita ser visualizada mediante una electroforesis. Posee un alto grado de detección, ya que dependiendo del protocolo implementado y de la estandarización de la técnica, pueden detectar hasta una copia del ADN o ARN de interés (44). Combina el PCR convencional con el uso de fluoróforos que reaccionan cada vez que se replica el genoma viral, combinando en un solo paso las etapas de amplificación y detección. La cantidad de fluorescencia emitida será directamente proporcional a la cantidad de ADN o ARN en la muestra. Los equipos necesarios para desarrollar la qPCR son un termociclador que brinde la temperatura adecuada en cada etapa de la prueba, un fluorómetro que permita detectar la fluorescencia emitida en cada amplificación y una computadora con el software adecuado para recoger y analizar los datos generados en la PCR. La fluorescencia emitida por la reacción de la qPCR puede detectarse mediante fluoróforos no específicos como los SYBR® Green o mediante primers o sondas específicas unidas a un fluoróforo (FRET) (45).

b.1. Tipos de fluoróforos:

- **Fluoróforos con afinidad por el ADN:**

Emiten fluorescencia una vez que se han unido al ADN y si la muestra presenta mayor concentración de ADN, la fluorescencia será mayor. El fluoróforo más utilizado es el SYBR Green, debido a que es económico y puede ser utilizado para diferentes pruebas. Una de las desventajas que presenta este fluoróforo es que no se puede realizar amplificaciones de varios genes simultáneamente (ensayos múltiples o multiplex), debido a que su falta de especificidad hace que se pueda unir a cualquier amplicón de ADN, por lo que es necesario verificar que la fluorescencia emitida pertenece a la amplificación del ADN de interés (44)

- **Sondas específicas:**

Emiten fluorescencia cuando se produce la amplificación de un fragmento de interés. Se basa en la transferencia de energía entre un fluoróforo que es el donador o reportero (Ejm.: DAM, NED, VIC) y otro fluoróforo que es el aceptor o también conocido como apagador o “*quencher*” (Ejm: TAMRA, BHQ, DABCYL). El *quencher* absorbe la fluorescencia del reportero cuando están cerca, por lo que al separarse ya no puede ser absorbida y puede ser detectada por el fluorómetro. Este tipo de sondas pueden ser de tres tipos:

- **Sondas de hidrólisis:** Se utiliza un oligonucleótido específico con un reportero en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo 3'. Al ser hidrolizado durante la amplificación por la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa, separa a los fluoróforos y emite fluorescencia. Las sondas TaqMan® son las más comunes.
- **Sondas de hibridación:** Se utiliza dos oligonucleótidos específicos, una sonda marcada con el reportero y la otra con el *quencher*. Este sistema funciona de forma opuesta a las sondas de hidrólisis, debido a que se sigue la señal del

reportero a medida que se va produciendo la amplificación del ADN. Mientras mayor sean las sondas hibridadas, mayor será la intensidad de la fluorescencia.

- **Sondas de horquilla:** Se utiliza un oligonucleótido en forma de horquilla con un reportero en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Al estar cerca por la forma de la sonda, el *quencher* se mantiene apagado, pero al unirse a la secuencia de interés, estos se separan, emitiendo fluorescencia que es detectada por el fluorómetro.

b.2. Cinética de amplificación.

La curva generada con la emisión de fluorescencia durante la etapa de amplificación representa la cinética de amplificación de la técnica de PCR (Figura 06).

- **Fase inicial o basal:** La fluorescencia emitida durante esta etapa es baja y no permite discriminarla del ruido basal, sin embargo, nos ayuda para definir la línea base.
- **Fase logarítmica o exponencial:** En esta etapa hay abundancia de los reactivos, por eso se da un incremento exponencial en la fluorescencia emitida. Su nombre proviene porque el material genético tiene un comportamiento exponencial de 2^n .
- **Fase lineal:** En esta etapa los reactivos son limitados y disminuye la emisión de la fluorescencia.
- **Fase estacionaria:** Esta etapa la amplificación se detiene, debido a que los reactivos se han agotado. Las reacciones se mantienen constantes, aunque se aumente el número de ciclos.

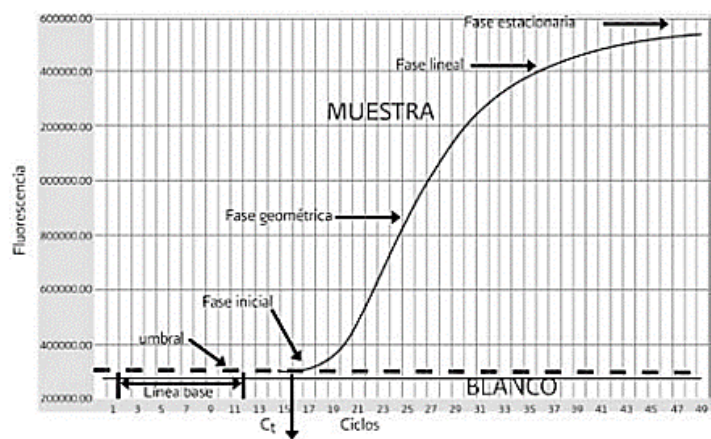


Figura 06. Cinética de la amplificación de la qPCR

Tomado de Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos 2014:189 (44)

I.11. ELISA NS1 vs RT-qPCR

Debido a que el presente trabajo busca remplazar la técnica ELISA NS1 por la técnica RT-qPCR, en la tabla 02, se muestran las ventajas y desventajas a tener en consideración para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

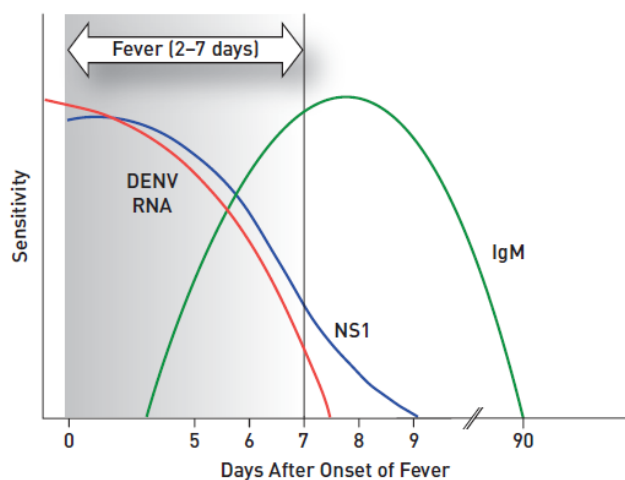


Figura 05: Sensibilidad relativa de las pruebas de diagnóstico de dengue
Tomado de Yellow Book 2020 (28)

Tabla 02: Tabla comparativa de las técnicas ELISA NS1 y RT-qPCR para el diagnóstico de dengue

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ELISA NS1	<ul style="list-style-type: none"> • El antígeno NS1 puede ser detectado desde el día de inicio de la fiebre hasta el noveno día (28). • Puede ser detectado en ciertos casos cuando el ARN viral es negativo (20). • Durante la fase aguda de la enfermedad, la probabilidad de encontrar la presencia de los antígenos NS1 es alta (31). • Es una técnica sencilla de realizar y su costo es económico (32). 	<ul style="list-style-type: none"> • No diferencia los serotipos. • La sensibilidad y especificidad varían entre las marcas de kits comerciales (Ver Tabla 01). • Todos los kits utilizan suero humano como muestra para el diagnóstico, pero solo algunos utilizan plasma humano (Ver Tabla 01). • Pueden presentar reactividad cruzada con otros flavivirus u otras enfermedades provocando falsos positivos (25). • Si la carga viral es baja, esta técnica puede no reconocer los antígenos provocando falsos negativos (19).
RT-qPCR	<ul style="list-style-type: none"> • Es el método recomendado para el diagnóstico de dengue, debido a que sus resultados tienen una alta sensibilidad y especificidad (19). • Si se tiene el equipamiento adecuado, este método representa una alternativa simple, rápida y económica para la detección del virus del dengue en muestras clínicas (37). • Es una técnica robusta, con una alta reproducibilidad para encontrar ciertos marcadores genéticos de interés. • Permite detectar los serotipos circulantes, lo cual, contribuye con su vigilancia. • Permite detectar la carga viral mediante la cuantificación del ARN del virus. • Puede detectar la presencia del ARN del virus, aunque la carga viral sea baja. • A diferencia del PCR convencional no necesita visualizarse los resultados en un gel. 	<ul style="list-style-type: none"> • La sensibilidad y especificidad dependerán del diseño de los <i>primers</i> y las sondas, si estos no son los adecuados, los resultados no serán los esperados (43). • La calidad de sus resultados dependerá de una buena extracción del ARN viral. • Es más susceptible a la contaminación. • Se pueden presentar falsos positivos como consecuencia de la reacción cruzada con los amplicones generados en la primera ronda de PCR y que sirven como molde para la segunda ronda (42). • Necesita mayor experiencia y preparación del personal técnico. • Requiere de equipos e infraestructura especializada. • Se limita al diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad (32). • Necesita ser estandarizada para cada organismo, lo cual representa tiempo y costos económicos elevados (47)

Fuente: Elaboración propia

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El contexto actual del país ocasionado por la pandemia de COVID-19 ha provocado que las autoridades se den cuenta de la gran brecha que existe a nivel nacional de contar con laboratorios descentralizados que realicen el diagnóstico de distintas enfermedades de salud pública mediante la técnica de RT-qPCR. Durante la pandemia se ha observado que el diagnóstico de dengue se confunde con casos de COVID-19 y viceversa, principalmente en las etapas tempranas de la enfermedad (48).

La mayoría de casos son asintomáticos, lo cual representa una complicación para determinar la extensión real de los casos de dengue. Además pueden presentarse infecciones simultáneas con otras enfermedades (otras arbovirosis, COVID-19, etc.), lo cual hace más complicado identificar la presencia de los signos de alarma y tener un correcto diagnóstico diferencial (49).

La prueba de ELISA NS1 es un método alternativo de detección temprana de la enfermedad, sin embargo, en algunos casos se pueden presentar falsos positivos y falsos negativos (50). Los resultados de la prueba ELISA NS1 son considerados como presuntivos por lo que son enviados al INS en la ciudad de Lima, donde solo una parte del total de muestras son procesadas mediante RT-qPCR para su confirmación (Ver tabla 09).

Los resultados de la prueba ELISA NS1 no permiten determinar que serotipo es el responsable de la infección, por lo tanto, no se puede prevenir una potencial complicación de los pacientes que adquieran una segunda infección ocasionada por un serotipo distinto al de la primera (32). Además, debido a que solo un parte de las muestras enviadas al INS

son procesadas por la técnica RT-qPCR, no se puede conocer la prevalencia real de los serotipos circulantes en la región Junín (Ver tabla 11).

Cuando se presentan los brotes de dengue pueden poner en riesgo los sistemas de salud debido al aumento de pacientes, colapsándolos y disminuyendo la atención que se podría brindar a otras enfermedades (51). El sistema de detección actual mediante la prueba de ELISA NS1 no contribuye a contrarrestar la rápida propagación de esta enfermedad, todo lo contrario, ya que los casos sospechosos de dengue son confirmados tardíamente, lo cual trae como consecuencia que las medidas que se toman también sean tardías.

Es por todo ello que resulta necesario estandarizar e implementar métodos de diagnósticos más sensibles que permitan detectar tempranamente los casos de dengue y sus serotipos.

III. JUSTIFICACIÓN

La OMS viene impulsando a que los gobiernos mejoren las herramientas tecnológicas y técnicas que fortalezcan el diagnóstico diferenciado de las arbovirosis en su red de laboratorios y centros de salud para que contribuyan a prevenir y controlar su propagación (12). La pandemia provocada por la COVID-19 ha permitido la implementación laboratorios descentralizados a nivel nacional. Los equipos que son utilizados para la detección molecular de la COVID-19 pueden ser utilizados para el diagnóstico de otras enfermedades de interés en la salud pública, como es el caso del dengue.

En la actualidad existen protocolos de identificación de diversos patógenos mediante técnicas moleculares debido a que presenta una alta sensibilidad y especificidad en sus resultados, además son consideradas como técnicas confirmatorias. La técnica de RT-qPCR ha podido ser empleada para la detección de microorganismos independientes de

cultivo o con una carga viral baja haciendo que los resultados resulten satisfactorios para los laboratorios que la han implementado como técnica de diagnóstico, siendo además considerada como una herramienta importante dentro del campo del diagnóstico microbiológico (52). Los resultados de la técnica RT-qPCR también pueden servir para estudios posteriores relacionados con genotipificación del DENV, lo cual es de gran ayuda para comparar muestras de diferentes procedencias geográficas.

La propagación del dengue empieza con los familiares de los pacientes infectados y luego son transmitidos hacia su comunidad más cercana. Al ser muchos de estos casos asintomáticos o pacientes que solo presentan síntomas leves, no se realiza un adecuado seguimiento de la distribución de esta enfermedad (53). Al implementar la técnica RT-qPCR, se podría confirmar la presencia de este virus en familiares cercanos asintomáticos. Los resultados obtenidos permitirán a los responsables de las estrategias de control y seguimiento de esta enfermedad en tomar las decisiones adecuadas para la mitigación de su propagación, así como en realizar un seguimiento a las comunidades con casos positivos y poder detectar de forma temprana posibles brotes de esta enfermedad.

La implementación de esta técnica en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN contribuiría en fortalecer la atención primaria de los casos de dengue, contribuyendo con mitigar su avance y reduciendo la probabilidad de que se puedan presentar casos graves de dengue. Además, la implementación exitosa de la técnica RT-qPCR para la detección molecular del virus del dengue, en el futuro contribuirá para que se pueda extender en el diagnóstico de otras enfermedades metaxénicas como es el caso de Chikungunya, Zika, Fiebre amarilla, Malaria y Leishmaniasis.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo principal:

- Diseñar una propuesta de implementación de la técnica RT-qPCR para la detección molecular temprana del virus dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

IV.2. Objetivos específicos:

1. Proponer una secuencia de *primers* y sondas que permitan detectar los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.
2. Determinar los criterios de estandarización de la prueba RT-qPCR.
3. Determinar las condiciones mínimas de operación de las pruebas RT-qPCR.
4. Proponer los criterios que aseguren la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR.
5. Evaluar los resultados de las pruebas de ELISA y de RT-qPCR previamente reportados en el sistema NETLAB.

V. METODOLOGÍA

V.1. Propuesta de una secuencia de *primers* y sondas para la detección del virus del dengue y sus serotipos.

El virus del dengue posee cuatro serotipos que son DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Si bien comparten muchas características, existen ciertas zonas de su genoma que son diferentes, por lo que no se puede utilizar solo una secuencia de *primers* y sondas

para su diagnóstico mediante la técnica RT-qPCR. Uno de los problemas para la elección de *primers* y sondas en un virus de ARN, es la gran variabilidad genética que presentan, por lo tanto, para disminuir los riesgos en la adhesión de estas secuencias a sus objetivos, se debe considerar que los *primers* y sondas puedan adherirse a la mayor cantidad de genotipos o linajes filogenéticos conocidos del virus (54). En la actualidad existen muchas herramientas informáticas de libre acceso como “Nucleotide-BLAST” de la “National Center for Biotechnology information – NCBI” (66), la cual sirve para buscar regiones homólogas mediante un alineamiento de las secuencias problema y las secuencias disponibles en la base de datos de información biológica (45).

Se revisó la bibliografía disponible sobre los *primers* y las sondas que están siendo utilizados para el diagnóstico de dengue y para identificar a que serotipo pertenece. Se tomaron en cuenta las secuencias conservadas dentro del genoma viral para que sirvan como zonas objetivo de los *primers* de sentido positivo y negativo (54). El análisis de los *primers* y las sondas se realizó siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- Se ingresó a la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, opción “Nucleotide BLAST”
- Se copió las secuencias problemas en la sección “Enter Query Sequence” y se definieron los parámetros.
 - “Data base” – “Standard databases (nr etc.)”
 - “Organism” – “Dengue virus”
 - “Program selection” – “Highly similar sequences (megablast)”
 - Los otros parámetros se dejaron por defecto.
- Botón “BLAST”

Figura 07: Vista de los resultados de la página “Nucleotide-BLAST”.

Sequences producing significant alignments		Download	New Select columns	Show	100				
Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate F-001 polyprotein (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	8354	OK598125.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DV3III-TM-20-07 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1479	MZ636818.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate FT_MD_80_R4_DENV3_III_India polyprotein (POLY) gene, partial cds; and siRNA1	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10366	MZ312921.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate FT_DNS1_505_S48_R3 polyprotein (POLY) gene, complete cds; and siRNA1 lncRN...	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10649	MK858151.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate MLN-016 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1479	MW648232.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate MLN-013 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1479	MW648231.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-341/2019 polyprotein (POLY) gene, complete cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10173	MZ544588.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-4167/2019 polyprotein (POLY) gene, complete cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10173	MZ544587.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-359/2019 polyprotein (POLY) gene, complete cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10173	MZ544586.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-355/2019 polyprotein (POLY) gene, complete cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	10173	MZ544585.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-3158/2019 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial...	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1479	MZ544507.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-337/2019 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1437	MZ544505.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-4157/2019 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial...	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1467	MZ544504.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-362/2019 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1440	MZ544503.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate Kenya/MTW-348/2019 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 3	39.4	39.4	100%	1.6	95.45%	1479	MZ544502.1

La herramienta “Nucleotide-BLAST” de la NCIB, nos permitió validar la especificidad de los *primers* y las sondas encontradas en la bibliografía. Se obtuvieron los porcentajes de homología, de cobertura, el "E-value" y los serotipos con los que coincidía las secuencias evaluadas.

V.2. Determinación de los criterios de estandarización de la prueba RT-qPCR.

Para que la técnica de RT-qPCR sea considerada como una herramienta de diagnóstico, primero debe ser estandarizada. Al ser una técnica que puede detectar cantidades mínimas de ácidos nucleicos (hasta una sola copia) es obligatorio que se analice su rendimiento, en especial, su sensibilidad (54). Para esto se debe realizar pruebas estandarizadas para conocer la cantidad de virus presente en la muestra (44).

El Protocolo de estandarización del procedimiento para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR se elaboró modificando los protocolos descritos por

Conceição et. al 2010 (55) y Palomino et. al 2010 (56). Los criterios que se tomaron en cuenta para una óptima elaboración del protocolo fueron: 1) las cepas de virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), 2) las líneas celulares (C6/36HT – *Aedes albopictus* ATCC), 3) las muestras de suero humano, 4) el medio de cultivo celular, 5) el diseño de los primers y las sondas TaqMan® (propuestas en el apartado VI.1.1 y VI.1.2), 6) el protocolo de extracción viral (anexo 07), 7) elaboración de la curva estándar y 8) el protocolo de RT-qPCR (anexo 08).

V.3. Determinación de las condiciones mínimas de operación de las pruebas RT-qPCR.

En esta sección se determinaron los recursos necesarios para la implementación y funcionamiento de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN. Se consideraron los recursos internos existentes como la infraestructura y el equipamiento (hardware y software). Se elaboraron los protocolos de trabajo para el desarrollo de cada actividad: 1) Protocolo de recepción y codificación de muestras (Anexo 05), 2) Protocolo de alicuotado de muestras (Anexo 06), 3) Protocolo de extracción de ARN viral (Anexo 07) y 4) Protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue (Anexo 08) y se consideró al personal necesario para el desarrollo de cada etapa. Los criterios definidos tienen la finalidad de desarrollar de manera rutinaria el diagnóstico de dengue mediante la técnica de RT-qPCR en el Laboratorio Referencial y asegurar su sostenibilidad en el tiempo.

V.4. Propuesta de los criterios que aseguren la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR.

En esta sección se propusieron los criterios que aseguren la calidad de los resultados obtenidos en el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

La técnica de RT-qPCR es una herramienta de diagnóstico con una alta sensibilidad en sus resultados, pero para asegurar la calidad de los mismos, debe ser desarrollada cuidadosamente desde la recepción de la muestra hasta su procesamiento, con la finalidad de reducir al mínimo la presencia de falsos positivos y falsos negativos (57). Para esto se establecieron controles para minimizar los riesgos, asegurar la calidad de los resultados y evitar efectos no deseados. Así mismo se determinaron ciertos parámetros a tener en consideración como los factores físicos (temperatura, iluminación, circulación de aire e higiene), condiciones de almacenamiento y mantenimiento de los reactivos, consideraciones para la manipulación adecuada de los equipos, equipos de protección personal para cada proceso y desempeño del personal.

V.5. Evaluación de los resultados de las pruebas de ELISA y de RT-qPCR previamente reportados en el sistema NETLAB.

En el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN se viene realizando el diagnóstico de dengue por medio de la técnica de ELISA NS1 para las muestras de suero de pacientes sospechosos provenientes de los centros de salud que no cuentan con laboratorios implementados con esta técnica para realizar el diagnóstico de dengue. Las muestras procesadas son enviadas al INS para su confirmación mediante la técnica RT-qPCR y sus resultados subidos al sistema NETLAB, de donde se obtuvo la información para realizar la evaluación y comparación de ambas técnicas de diagnóstico.

Los datos se obtuvieron teniendo como consideración el inicio de la pandemia hasta la fecha del inicio del presente trabajo (18 meses) y se comparó con los casos reportados en la misma cantidad de tiempo de la etapa pre pandémica. Por lo tanto, los datos obtenidos para la evaluación de los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y RT-qPCR fueron de los últimos 3 años (septiembre 2018 – agosto 2021) (tabla 09). Los resultados de las pruebas RT-qPCR para el diagnóstico de dengue (245 muestras) fueron comparadas con las muestras procesadas con sus resultados de ELISA NS1 realizadas en el laboratorio referencial durante este periodo de tiempo (tabla 10). Finalmente, de los casos positivos se determinó las frecuencias de los serotipos circulantes de las muestras procesadas (tabla 11).

V.5.1. Evaluación de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y Odds ratio de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR

En base a las frecuencias y porcentajes de los casos positivos y negativos entre las pruebas realizadas con ELISA NS1 y RT-qPCR, se calculó la sensibilidad, eficiencia, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), la proporción de falsos positivos y falsos negativos utilizando las siguientes fórmulas (58): % sensibilidad = $a/(a + c) \times 100$; % especificidad = $d/(b + d) \times 100$; % VPP = $a/(a + b) \times 100$; % VPN = $d/(c + d) \times 100$; Odds ratio diagnóstico $(a / c) / (b / d)$. Donde: a es el número de verdaderos positivos, b es el número de falsos positivos, c es el número de falsos negativos y d es el número de verdaderos negativos. Los resultados se muestran en la tabla 12.

V.5.2. Evaluación de los resultados de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR mediante el Test de diagnósticos binarios.

El método del Test de diagnóstico binario es una de las mejores herramientas estadísticas en el área médica para comparar dos técnicas de diagnóstico. La evaluación puede realizarse entre una técnica de diagnóstico de interés y la que es considerada como “Gold estándar”. Su utilidad radica en que nos permite diferenciar entre dos resultados: positivo y negativo (binario) y la probabilidad de que la técnica de diagnóstico utilizada permita discriminar la verdadera condición del paciente. La sensibilidad nos indica la probabilidad de que el resultado del diagnóstico sea positivo cuando el paciente realmente presente la enfermedad y la especificidad nos indica la probabilidad de que el resultado del diagnóstico sea negativo cuando el paciente no tenga la presencia de la enfermedad (59).

Los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y RT-qPCR fueron comparados mediante un Test de diagnóstico binario. Se generó una base de datos en Microsoft Excel ® versión 2016 y se elaboró una tabla de frecuencias. La información fue exportada hacia el programa R statistics © versión 4.1.1, donde se utilizó la función utilizada por Delgado, L. (2015) de la estimación de la exactitud de un test de diagnóstico binario o “eetdb” (60). Se consideró un intervalo de confianza (IC) de < 0.05 (61).

VI. RESULTADOS

VI.1. Evaluación de los *primers* y las sondas encontradas en la bibliografía

Las secuencias de *primers* y sondas fueron obtenidas mediante la búsqueda bibliográfica de artículos científicos centrados en diseñar secuencias específicas para su uso en el diagnóstico de dengue mediante la técnica de PCR. Las secuencias evaluadas estaban diseñadas para amplificar regiones específicas dentro de la cadena de ARN del DENV. Entre las regiones objetivo dentro del genoma viral se encontraban las regiones: UTR 3', UTR5', Gen C, Gen E, Gen NS1, Gen PrM, Gen NS2a, Gen NS2b y Gen NS5.

El tiempo de procesamiento que demoró el programa “Nucleotide-BLAST” fue corto (aproximadamente 15 segundos) debido a que los *primers* y las sondas eran secuencias cortas. Al finalizar el programa reportó una lista de los mejores 100 alineamientos exitosos con las secuencias evaluadas (figura 07).

VI.1.1. Propuesta de *primers*

Las secuencias que codifican al Gen E y al Gen C fueron las más utilizadas como regiones objetivo con 24 *primers* cada uno. La mayoría de secuencias evaluadas presentaba un índice de cobertura y similitud del 100%. El valor más bajo registrado para el índice de similitud fue de 86.9% para el *primer forward* GAACATGGRACAAYTGCAACYAT que tiene como objetivo la región del Gen E del serotipo DENV-1. Para el índice de cobertura, el valor más bajo registrado fue 61% perteneciente al *primer reverse* AAGACGTAAATAGCCCCCGAC que tiene como objetivo la región del Gen C del serotipo DENV-3. Con respecto al valor de E, el valor más cercano a cero fue $6e^{-9}$ para los *primers reverse* GAAACCCAATACATTTTCATGAGTAGAATT que tiene como objetivo la región del Gen NS5 del serotipo DENV-1 y TTGCACCAACAGTCAATGTC TTCAGGTTC que tiene como objetivo la región del Gen C-PrM utilizada para la detección universal de los cuatro serotipos DENV. El valor más alejado de cero fue 9.1

para el *primer reverse* AAGACGTAAATAGCCCCCGAC que tiene como objetivo la región del Gen C del serotipo DENV-3. El *primer forward* GGTGACRTTYAARGTHCC TCAT y el *primer reverse* WGARTGCATRGCTCCYTCCTG que tienen como objetivo la región del Gen E del serotipo DENV-4 no mostraron resultados para el análisis realizado. El detalle del análisis se encuentra en el Anexo 02.

En base a los resultados obtenidos se compararon las secuencias con mejor resultado (índice de cobertura, índice de similitud y valor de E) con las secuencias usadas actualmente por el INS para proponer las secuencias de *primers* utilizadas para el diagnóstico de dengue (Tabla 03).

Tabla 03: Secuencia de primers propuestas para el diagnóstico de dengue

Serotipos	Secuencias utilizadas por el INS	Secuencias propuestas
DENV-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT
Homología	100.0%	96.4%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$5e^{-4}$	$1e^{-7}$
Región objetivo	Gen E	Gen NS5
Coincidencia	DENV-1	DENV-1
DENV-1 R	CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTT
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$1e^{-6} - 2e^{-5}$	$6e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen C-PrM
Coincidencia	DENV-1	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4
DENV-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	82.0%	100.0%
Valor de E	$5e^{-5} - 0.003$	$3e^{-7}$
Región objetivo	Gen E	UTR 5' – Gen C
Coincidencia	DENV-2	DENV 2

Tabla 03: Secuencia de *primers* propuestas para el diagnóstico de dengue
(Continuación)

Serotipos	Secuencias utilizadas por el INS	Secuencias propuestas
DENV-2 R	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	86.0% - 100.0%	100.0%
Valor de E	$5e^{-5}$	$6e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen C-PrM
Coincidencia	DENV-2	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4
DENV-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC
Homología	100.0%	96.0% - 100.0%
Cobertura	85.0% - 100.0%	100.0%
Valor de E	$5e^{-5} - 0.031$	$7e^{-6}$
Región objetivo	Gen E	UTR 3'
Coincidencia	DENV-3	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4
DENV-3 R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
Homología	96.1% - 100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$3e^{-7} - 5e^{-6}$	$6e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen C-PrM
Coincidencia	DENV-3	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4
DENV-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTTCG	AAGCCAGGAGGAAGCTGTACTCCT
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$2e^{-4}$	$4e^{-6}$
Región objetivo	Gen E	Gen NS2a
Coincidencia	DENV-4	DENV-4
DENV-4 R	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$5e^{-4}$	$6e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen C-PrM
Coincidencia	DENV-4	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

VI.1.2. Propuesta de sondas

Las secuencias que codifican al Gen C y al Gen E fueron las regiones objetivo más utilizadas con 10 y 8 sondas respectivamente. La mayoría de secuencias evaluadas presentaba una cobertura y similitud del 100%. El valor más bajo registrado para el índice de similitud fue de 92.5% para la sonda TGGTRGACA GAGGATGGGGRAATGGAT que tiene como objetivo la región del Gen E del serotipo DENV-2. Para el índice de cobertura, el valor más bajo registrado fue 82% perteneciente a la sonda CATGTGGTTGGGAGCACGC que tiene como objetivo la región del Gen E del serotipo DENV-1. Con respecto al valor de E, el valor más cercano a cero fue $3e^{-10}$ para la sonda AGCATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTC AGCTGT que tiene como objetivo la región del Gen C del serotipo DENV-2. El valor más alejado de cero fue 1.4 para la sonda CGATGGARTGCTCTC que tiene como objetivo la región del Gen E del serotipo DENV-2. El detalle del análisis se encuentra en el Anexo 03.

En base a los resultados obtenidos se compararon las secuencias con mejor resultado (índice de cobertura, índice de similitud y valor de E) con las secuencias usadas actualmente por el INS para proponer las secuencias de sondas utilizadas para el diagnóstico de dengue (Tabla 04).

VI.2. Parámetros para la estandarización de la prueba RT-qPCR.

Los parámetros utilizados para realizar la estandarización de la prueba RT-qPCR para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN fueron descritas en la tabla 05.

Para la estandarización del método se elaboraron dos paneles, el primero constituido de virus aislados en células C6/36HT de mosquitos *Aedes albopictus* y el segundo de

muestras de suero humano provenientes de pacientes con fases agudas o tempranas de la enfermedad (de 0 a 5 días del inicio de los síntomas).

Tabla 04: Secuencia de sondas TaqMan® propuestas para el diagnóstico de dengue

Serotipos	Secuencias utilizadas por el INS	Secuencias propuestas
DENV-1 P	CATGTGGTTGGGAGCACGC	AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCG
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	82.0%	93.0% - 100.0%
Valor de E	$3e^{-4}$	$3e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen NS5
Coincidencia	DENV-1	DENV-1 y DENV-3
DENV-2 P	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	AGCATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGCTGT
Homología	96.3%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$8e^{-8}$ - $1e^{-6}$	$3e^{-10}$
Región objetivo	Gen E	Gen C
Coincidencia	DENV-2	DENV-2
DENV-3 P	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	CACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGA
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$3e^{-7}$	$6e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen C
Coincidencia	DENV-3	DENV-1 y DENV-3
DENV-4 P	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC
Homología	100.0%	100.0%
Cobertura	100.0%	100.0%
Valor de E	$3e^{-7}$	$2e^{-9}$
Región objetivo	Gen E	Gen NS5
Coincidencia	DENV-4	DENV-4

Tabla 05: Parámetros para la estandarización de la prueba RT-qPCR

Cepas virales	DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4
Líneas celulares	C6/36HT ATCC - <i>Aedes albopictus</i>
Muestras	Suero humano (2ml)
Medio de cultivo celular	E-MEM
Primers	DENV-1 F GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT DENV-1 R TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC DENV-2 F AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA DENV-2 R TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC DENV-3 F AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC DENV-3 R TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC DENV-4 F AAGCCAGGAGGAAGCTGTACTCCT DENV-4 R TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
Sondas TaqMan®	DENV-1 P (FAM) AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAAGTTGACACGCG (BHQ-1) DENV-2 P (HEX) AGCATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGCTGT (BHQ-1) DENV-3 P (TxRed) CACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGA (BHQ-2) DENV-4 P (Cy5) TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC (BHQ-3)
Extracción de ARN viral	Protocolo de extracción de ARN viral
Curva estándar	Diluciones seriadas (10^{10} - 10^1 copias)
RT-qPCR	Protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue

Se verificó que los fluoróforos utilizados por cada sonda sean compatibles con el equipo CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA). El protocolo de estandarización del procedimiento para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR fue elaborado considerando muestras derivadas de cultivos celulares y de suero humano. Este protocolo se encuentra detallado en el anexo 04.

VI.3. Determinar las condiciones mínimas de operación de las pruebas RT-qPCR.

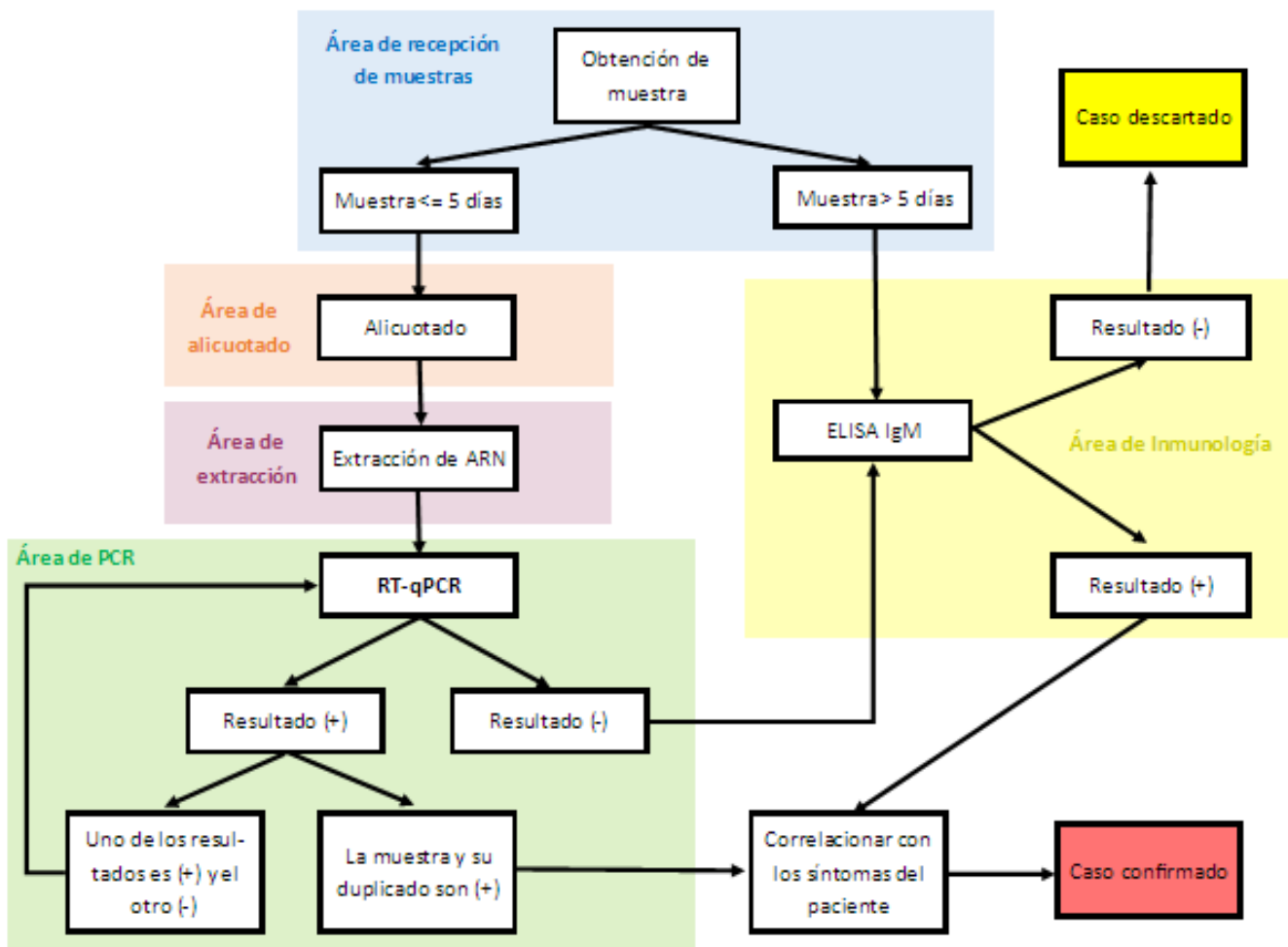
Las condiciones mínimas requeridas realizar el diagnóstico de dengue mediante RT-qPCR en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN fueron descritas en la tabla 06. Se consideraron los recursos internos disponibles como la infraestructura

Tabla 06: Condiciones mínimas requeridas para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR en el Laboratorio referencial.

Proceso	Entradas	Procedimiento	Salidas	Infraestructura requerida	Equipamiento requerido	Personal necesario
Recepción de muestras	Muestra de suero humano (2ml)	Ver protocolo de recepción y codificación de muestras (Anexo N°5)	Muestra de suero humano (2ml) codificada	Área de recepción de muestras	<ul style="list-style-type: none"> • Refrigeradoras y congeladoras. • Reguladores de voltaje. • Juego de micropipetas • Computadora con internet • Lectora de código de barras. • Impresora de código de barras 	2 personas
Alicuotado de muestras	Muestra de suero humano (2ml) codificada	Ver protocolo de alicuotado de muestras (Anexo N° 6)	Alícuota de 250 µl	Área de alicuotado	<ul style="list-style-type: none"> • Cabina de bioseguridad • Juego de micropipetas • Refrigeradora • Reguladores de voltaje 	1 persona
Extracción de ARN viral	Alícuota de 250 µl	Ver protocolo de extracción de ARN viral (Anexo N° 7)	ARN extraído	Área de extracción	<ul style="list-style-type: none"> • Cabina de bioseguridad • Juego de micropipetas • Reguladores de voltaje • Refrigeradora • Baño maría para laboratorio 	2 personas
RT-qPCR	ARN extraído	Ver protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue (Anexo N° 8)	Resultado positivo o negativo de la muestra	Área de PCR	<ul style="list-style-type: none"> • CFX96™ Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) • Computadoras con el software del termociclador (Bio-rad CFX Manager). • Cabina de bioseguridad • Juego de micropipetas • Refrigeradora • Reguladores de voltaje 	2 personas

y el equipamiento. Se elaboraron los protocolos para recepción de muestras (descrito en el anexo 05), alicuotado de muestras (descrito en el anexo 06), extracción de ARN (descrito en el anexo 07) y el desarrollo de RT-qPCR (descrito en el anexo 08). Se establecieron las entradas y salidas de cada proceso y finalmente se determinó el personal necesario para el desarrollo de cada actividad.

Figura 08: Esquema del proceso para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio referencial



Fuente: Elaboración propia

En la figura 08 se elaboró el esquema del proceso para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR. Durante la recepción de la muestra se determina si los días entre el inicio de los síntomas y la toma de la muestra no supera los cinco días (fase aguda). Se toma una alícuota de la muestra, se extrae el ARN viral y finalmente se procesa mediante RT-qPCR. Si el resultado de la muestra y su contramuestra resulta positivo, se corrobora con los síntomas de la ficha epidemiológica (Anexo 09) y se confirma el caso. Si la muestra o la contramuestra resulta positiva y la otra negativa se repite la prueba. Si ambos resultados resultan como negativos, se realiza una nueva prueba mediante la técnica ELISA IgM, de resultar positiva se corrobora con los síntomas de la ficha epidemiológica y se confirma el caso (infección reciente). Si resulta negativa se descarta el caso (muestra negativa para dengue).

VI.4. Determinación de los criterios que aseguren la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR.

VI.4.1. Parámetros del control de calidad de las muestras

Para asegurar la calidad de los resultados de las pruebas RT-qPCR se establecieron controles en todos los procesos. Durante el proceso de recepción de muestras se establecieron criterios de inclusión y exclusión a las muestras que llegan al Laboratorio referencial para el diagnóstico de dengue. Estos criterios son detallados en el Protocolo de recepción y codificación de muestras (anexo 05). Para los procesos de alicuotado de muestras, extracción de ARN y RT-qPCR, cada uno contó con un control de ensayo. En la tabla 07 se indican estos controles y cuál es su finalidad.

VI.4.2. Parámetros del control de calidad de los procesos

La calidad de los resultados también está influenciada por el desarrollo adecuado de cada proceso. Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron: 1) Equipos de protección personal (EPP): donde se indicó el equipamiento necesario que debe ser utilizado en cada proceso. 2) Limpieza y desinfección: donde se establecieron los criterios de limpieza de las áreas de trabajo, así como la desinfección de los materiales y equipos que son utilizados durante cada proceso. 3) Factores físicos: donde se establecieron los criterios relacionados a la circulación de aire y la iluminación. 4) Almacenamiento y manipulación: donde se establecieron los criterios relacionados a la manipulación adecuada de los equipos y reactivos, así como la información establecida por sus fabricantes. La temperatura de almacenamiento también está considerada en esta sección. 5) Cumplimiento del protocolo: donde se establecieron ciertos criterios a tener en cuenta durante el seguimiento de los pasos establecidos en los protocolos de recepción y codificación de muestras (anexo 05), alicuotado de muestras (anexo 06), extracción de ARN viral (anexo 07) y protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue. 6) Manipulación de los equipos: donde se establece los criterios que se deben seguir para preservar la vida útil de los equipos del laboratorio. 7) Calidad de las muestras: donde se establecen criterios complementarios sobre el estado de las muestras que llegan al Laboratorio referencial para el diagnóstico de dengue. 8) Desempeño del personal: donde se establecen los criterios que el personal de cada proceso debe tener en consideración al realizar sus tareas y finalmente 9) Consideraciones generales: donde se indican recomendaciones generales que deben ser tenidas en cuenta en cada proceso. Estos parámetros son descritos en la tabla 08.

Tabla 07: Parámetros de control de calidad de los controles

Proceso	Control	Finalidad
Alicuotado de muestras	Control de alicuotado	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer la presencia de potenciales contaminantes durante la etapa de alicuotado.
Extracción de ARN	Control de extracción	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer la presencia de potenciales contaminantes durante la etapa de extracción de ARN.
RT-qPCR	Control positivo	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer la calidad del ARN. • Determinación de un mal funcionamiento potencial de los <i>primers</i> y de la retro transcriptasa reversa. • Conocer la presencia de inhibidores.
	Control negativo	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer si hay presencia de potenciales contaminantes durante la etapa RT-qPCR. • Determinación de un mal funcionamiento potencial de los <i>primers</i>.
	Control interno	<ul style="list-style-type: none"> • Conocer si hay presencia de potenciales contaminantes durante la etapa RT-qPCR. • Conocer la presencia de inhibidores.

VI.5. Evaluación de los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y de RT-qPCR previamente reportados en el sistema NETLAB.

V1.5.1. Resultados de las pruebas ELISA NS1 y RT-qPCR

Durante el periodo comprendido entre septiembre 2018 y agosto 2021 en el Laboratorio Referencial se procesaron 3053 muestras con la prueba de ELISA NS1 de pacientes con sospecha de dengue. Durante este periodo se observó que actualmente, en el año 2021 (periodo enero-agosto del 2021) se recolectó el mayor número de muestras de pacientes con sospecha de dengue (Tabla 09).

Tabla 08: Criterios para el control de calidad de los procesos

Criterio	Recepción de muestras	Alicotado de muestras	Extracción de ARN viral	RT-qPCR
Equipos de protección personal (EPP)	<ul style="list-style-type: none"> • Bata o mandil de laboratorio • Mascarilla • Guantes de látex o de nitrilo descartables. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bata o mandil de laboratorio. • Mascarilla • Protector facial • Guantes de nitrilo libres de talco descartables. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bata o mandil de laboratorio • Mascarilla • Protector facial • Cubre calzados • Guantes de nitrilo libres de talco descartables. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Los EPP deben estar en buen estado y solo deben ser utilizados en el área donde se lleva a cabo cada actividad. • Los guantes deben ser utilizados sin la presencia de anillos, pulseras o relojes que puedan dañarlos. 			
Limpieza y desinfección	<ul style="list-style-type: none"> • Desinfectar con hipoclorito de sodio al 1% los empaques y todas las superficies de las muestras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los instrumentos y equipos de trabajo deben ser limpiados y desinfectados periódicamente con etanol al 70%. • Los materiales utilizados deben ser tratados con luz UV por 10 minutos al inicio y al final de cada procedimiento. • La limpieza debe realizarse con materiales que no desprendan pelusas. • Eliminar cualquier rastro de alcohol de 70%, debido a que este puede inhibir el procedimiento de RT-qPCR. 		
	<ul style="list-style-type: none"> • El personal debe realizar el lavado de manos antes y después del desarrollo de cada actividad. 			
Factores físicos	<ul style="list-style-type: none"> • El ambiente debe mantenerse ventilado con un buen flujo de aire. 	<ul style="list-style-type: none"> • El flujo de trabajo siempre debe encontrarse en la misma dirección, para reducir la potencial contaminación de las muestras amplificadas mediante PCR. • Evitar el tránsito continuo del personal mientras se desarrollan las actividades. 		
				<ul style="list-style-type: none"> • Evitar la sobrexposición de las muestras a la luz.
Almacenamiento y manipulación	<ul style="list-style-type: none"> • Para el almacenamiento de otros reactivos se debe considerar la información indicada por el fabricante. • Si la información no está especificada debe considerarse como criterio de almacenamiento un ambiente seco a temperatura 2°C – 8°C. • Las muestras deben ser almacenadas de forma separada. • Evitar la exposición de materiales que no se puedan esterilizar adecuadamente a materiales potencialmente infecciosos. • Los tips, envases y otros insumos utilizados que hayan tenido contacto con las muestras durante el desarrollo de cada actividad deben ser dispuestos en los contenedores adecuados 			

Tabla 08: Criterios para el control de calidad de los procesos (Continuación)

Criterio	Recepción de muestras	Alicuotado de muestras	Extracción de ARN viral	RT-qPCR
Almacenamiento y manipulación	<ul style="list-style-type: none"> Evitar el congelamiento y descongelamiento de las muestras. 			
			<ul style="list-style-type: none"> Todos los reactivos deben ser utilizados antes de la fecha de su vencimiento, verificar que los lotes coincidan y que sean almacenados en las condiciones brindadas por los fabricantes. Las muestras que se presuman o resulten ser positivas, deben ser almacenadas en un lugar separado, evitando estar cerca de los materiales y equipos utilizados para evitar la contaminación cruzada con las otras muestras 	
			<p><u>Kit de extracción manual (Mole Bioscience, Taizhou, China)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> La información del fabricante indica que los resultados de este kit son confiables y tienen validez si los reactivos son conservados a temperatura ambiente (15°C – 30°C) sin humedad por 12 meses. Cuando la temperatura es menor a 15°C, los buffers de lavado y lisis pueden cristalizarse. De presentarse cristales en estas soluciones, deberán disolverse utilizando baño maría con una temperatura de entre 50°C y 60°C. 	<p><u>Kits de RT-qPCR</u></p> <ul style="list-style-type: none"> La información del fabricante indica que los resultados de este kit son confiables y tienen validez por 6 meses si los reactivos son conservados a una temperatura de -20°C. Para ser usados, deben ser llevados a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Una vez utilizados deben regresar a -20°C.

Tabla 08: Criterios para el control de calidad de los procesos (Continuación)

Criterio	Recepción de muestras	Alicotado de muestras	Extracción de ARN viral	RT-qPCR
Almacenamiento y manipulación	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras deben ser manipuladas con extremo cuidado por el personal para evitar su contaminación. Todas las muestras deben ser manipuladas considerando la presencia del virus o cualquier otro agente infeccioso generar en el personal una posible enfermedad infecciosa 			
Cumplimiento del protocolo		<ul style="list-style-type: none"> Para reducir la contaminación cruzada entre las muestras, evitar abrir dos o más tubos simultáneamente. 		
			<ul style="list-style-type: none"> Los materiales descartables utilizados deben ser libres de RNAsas. No abrir los tubos y las placas después de realizar el procedimiento, para evitar la contaminación por amplicones. No combinar los reactivos de cada kit, con reactivos de otras marcas y si son de la misma marca, de preferencia deben ser utilizados los reactivos que pertenezcan a un mismo número de lote. 	
Manipulación de los equipos	<ul style="list-style-type: none"> Todos los equipos eléctricos deben estar conectados a un regulador de voltaje que evite la interrupción de las pruebas en caso se presente un corte eléctrico. Seguir las instrucciones indicadas por el fabricante. Cumplir con los pasos establecidos en los protocolos (Anexo N°6, Anexo N°7 y Anexo N° 8). El equipo de PCR, micropipetas y otros instrumentos de medida deben estar correctamente calibrados. 			
Calidad de las muestras	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras de suero deben ser enviadas al laboratorio referencial el mismo día de su recolección, de lo contrario, deben ser almacenadas y conservadas en refrigeración (-20°C). Las muestras deben ser transportadas manteniendo la temperatura entre 0°C- 8°C, manteniendo el triple empaque en contenedores térmicos sin grietas. Una vez que las muestras llegaron al Laboratorio referencial, el personal encargado de su recepción, debe verificar que la temperatura de las muestras se encuentre entre los 2°C y 8°C, que no se encuentren derramadas y que contengan la cantidad suficiente para su procesamiento (2 ml). 			

Tabla 08: Criterios para el control de calidad de los procesos (Continuación)

Criterio	Recepción de muestras	Alicotado de muestras	Extracción de ARN viral	RT-qPCR
Desempeño del personal	<ul style="list-style-type: none"> • Cada actividad debe ser desarrollada por personal calificado, entrenado en los procedimientos de laboratorio que desempeñan y en los equipos que se utilizan en cada actividad. • El personal debe estar consiente de los riesgos biológicos que implica el desarrollo de cada actividad, así como los procedimientos de seguridad que minimicen estos riesgos. • Cada actividad debe ser desarrollada teniendo en consideración las buenas prácticas de laboratorio, usar los correctos equipos de protección personal • Los operadores deben ser profesionales que se encuentren entrenados y capacitados en el manejo de los equipos y los materiales necesarios para el desarrollo de esta técnica. 			
Consideraciones generales	<ul style="list-style-type: none"> • Cada actividad debe ser desarrollada en su propio ambiente, los cuales deben estar aislados entre sí. • Evitar tocar interruptores, celulares u otros objetos. • Evitar comer, tomar bebidas o fumar. • Evitar el contacto con los ojos, nariz y boca. 			

Tabla 09: Número de muestras con sospecha de dengue procesadas mediante la técnica ELISA NS1 durante el periodo de septiembre del 2018 a agosto del 2021.

Año	Número de muestras
2018	6
2019	615
2020	1014
2021	1418
Total	3053

Del total de muestras comprendidas durante este periodo, el INS procesó 245 muestras (8.02%) mediante la técnica RT-qPCR (Ver Anexo 10). Se compararon los resultados de ambas técnicas para la misma muestra y se determinó la cantidad de verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos (Tabla 10).

Tabla 10: Tabla de frecuencias de los resultados de las pruebas de ELISA NS1 y RT-qPCR.

		Resultados de la prueba de ELISA		Total
		Positivo	Negativo	
Resultados de la prueba RT-qPCR	Positivo	92	12	104
	Negativo	18	123	141
	Total	110	135	245

Sombreado naranja: Falsos positivos

Sombreado verde: Falsos negativos

La técnica RT-qPCR fue considerada como la técnica “Gold estándar” y sus resultados fueron considerados como la verdadera condición de los pacientes. Del total de muestras que fueron procesadas mediante ELISA NS1 y RT-qPCR, los resultados de la técnica ELISA NS1 mostraron que 110 muestras eran positivas, de las cuales 92 muestras fueron

confirmadas mediante la técnica RT-qPCR (verdaderos positivos). La diferencia fue considerada como el número de falsos positivos (18 muestras). Para los casos negativos, la técnica de ELISA NS1 determinó la negatividad de 135 muestras, de las cuales 123 muestras fueron confirmadas mediante la técnica RT-qPCR (verdaderos negativos). La diferencia fue considerada como el número de falsos negativos (12 muestras).

Tabla 11: Tabla de frecuencias de los serotipos encontrados en las pruebas positivas

Casos positivos = 104			
DENV 1.	DENV 2	DENV 3	DENV 4
5	99	0	0

De las 104 muestras diagnosticadas como positivas mediante la técnica RT-qPCR se encontró que 5 muestras fueron del serotipo DENV 1 y 99 muestras fueron del serotipo DENV 2. No se reportó casos provocados por los serotipos DENV 3 y DENV 4 (Tabla 11).

V1.5.2. Cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y Odds ratio.

La determinación de los verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos permitió que se pueda calcular los parámetros de sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y Odds ratio diagnóstico son descritos en la tabla 12.

Tabla 12: Determinación de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y odds ratio.

Parámetros	Valores
Sensibilidad (%)	88.46%
Especificidad (%)	87.23%
Valor predictivo positivo (VPP) (%)	83.63%
Valor predictivo negativo (VPN) (%)	91.11%
Falsos positivos (%)	12.77%
Falsos positivos (%)	11.54%
Odds ratio diagnóstico	1.12

V1.5.3. Cálculo de la sensibilidad y especificidad mediante el Test de diagnósticos binarios.

El cálculo de la sensibilidad y la especificidad mediante el Test de diagnósticos binarios determinó que la estimación de la sensibilidad era de 88.46 % con un error estándar de 0.94. El intervalo de confianza al 95 % para la sensibilidad fue de 0.81 - 0.93. Para la estimación de la especificidad la prueba determinó que esta era de 87.23 % con un error estándar de 0.93. El intervalo de confianza al 95% para la especificidad fue de 0.80 - 0.91. La programación del Test de diagnósticos binarios en el programa estadístico R© se muestra detalladamente en el anexo 11.

VII. DISCUSIÓN

En la actualidad las técnicas moleculares se han convertido en una alternativa confiable que contribuyen en el diagnóstico de distintas enfermedades, aunque es importante

entender que estas técnicas son complementarias a las técnicas de diagnóstico tradicionales (52). La técnica RT-qPCR sigue siendo una de las mejores técnicas moleculares que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de distintas enfermedades de salud pública. Sin embargo, su aplicación necesita ser optimizada y estandarizada de manera individual (44). La propuesta de su implementación debe tener un diseño adecuado que contribuya con la obtención de datos de calidad. En este sentido se propone en este trabajo seguir una secuencia de pasos teóricos para la adecuada estandarización de esta técnica.

Como primer paso se revisó la bibliografía relacionada con el uso de *primers* y sondas específicas para el diagnóstico de dengue, se seleccionaron las secuencias que se unían a ciertas regiones específicas buscando asegurar el éxito del diagnóstico mediante la técnica del RT-qPCR. El algoritmo de la herramienta "Nucleotide-BLAST" nos permitió comparar la similitud de los *primers* y las sondas en distintas bases de datos. Los resultados obtenidos fueron un conjunto de alineamientos para la secuencia de interés evaluada. Los porcentajes de cobertura y homología deben ser del 100% para que la secuencia del primer sea considerada como óptima. Además, nos brinda el "E-value" o "valor esperado"(62). Mientras este valor sea más bajo significa que hay una mayor homología entre la secuencia problema y las secuencias encontradas en la base de datos del programa, lo cual brinda una mayor confianza para que la secuencia evaluada pueda ser utilizada (45). Según Kerfeld & Scott (2011) los valores óptimos para el valor de "E" son aquellos cuyos resultados son menores a 0,00001 ($1e^{-5}$), lo cual normalmente sugiere que las secuencias evaluadas son homólogas. Para las secuencias de *primers* y sondas propuestas (tabla 03 y tabla 04) se consideraron a los que presentaron los valores más

bajos de “E” para cada serotipo como candidatos óptimos para ser utilizados en la detección del virus del dengue mediante la técnica RT-qPCR.

En la bibliografía consultada, dentro de las consideraciones que se toman en cuenta en el diseño de *primers* y sondas para amplificar una región genómica determinada con una alta especificidad y sensibilidad tenemos: 1) que el contenido de G+C estaba entre 40 y 75% (42); 2) la temperatura de alineamiento se encontraba entre 55 y 60 °C (44); 3) las secuencias no presentaban más de tres repeticiones de una sola base en zonas consecutivas (45); 4) considerar que los *primers* y las sondas puedan adherirse a la mayor cantidad de genotipos o linajes filogenéticos conocidos del virus para disminuir los riesgos en la adhesión de estas secuencias a sus objetivos (54) y 5) que la longitud de las secuencias sea entre 16 y 30 nucleótidos. Cuando el tamaño de las secuencias son muy largas pueden provocar que se formen dímeros y estructuras secundarias, mientras que si son muy cortas, disminuye su especificidad (63).

Uno de los problemas que se presentan en las técnicas de análisis por RT-qPCR es que la amplificación de una secuencia puede opacar a otra secuencia debido a la competencia por el alineamiento de secuencias inespecíficas (42). Mientras mayor sea la cantidad de *primers* y sondas utilizadas para el diagnóstico se garantiza la sensibilidad del diagnóstico, sin embargo, se reduce su alcance aumentando la probabilidad de amplificar secuencias inespecíficas (52). Por lo tanto, en el presente trabajo se propone una secuencia de *primer forward*, una secuencia de *primer reverse* y una sonda TaqMan® para la detección de cada serotipo. De esta forma se garantiza un buen diagnóstico en muestras con alta o baja carga viral. A diferencia de las sondas SYBR Green, las sondas TaqMan® son más específicas, por lo que se reduce la posibilidad que se unan a secuencias erróneas y generen productos inespecíficos, reduciendo el éxito de la RT-qPCR (64). Si bien es

una técnica más costosa, los resultados que se obtendrán serán rápidos y con una mayor sensibilidad lo cual significa una mejor calidad en la información disponible para los responsables de las estrategias de prevención y control de la enfermedad.

En la bibliografía consultada se pudo observar, distintos protocolos diseñados para el diagnóstico del dengue. El protocolo descrito por Mun et. al (2019) propone el diagnóstico mediante la técnica RT-qPCR en un solo paso donde los *primers* y las sondas diseñadas para este tipo de pruebas están diseñadas para unirse a secuencias conservadas comunes en todos los serotipos (65). Otra alternativa es el protocolo descrito por Waggoner et. al (2016) donde combina el diagnóstico del DENV con otros virus como Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV) en un RT-qPCR múltiple con *primers* que se unan a secuencias conservadas entre estos virus con la finalidad de agilizar el proceso y reducir los costos de las pruebas. Sin embargo, este tipo de pruebas aumentan la probabilidad de que se presenten falsos positivos (66). El protocolo descrito por Kim & Hwang (2020) es una combinación entre el diseño de una secuencia de *primers forward* y *reverse* que amplifiquen una secuencia objetivo común a los cuatro serotipos y aparte diseñan una secuencia de sondas específicas para cada serotipo (67). Finalmente, otros protocolos como el descrito por Peña et. al (2016) son estandarizados para extraer el ARN directamente de mosquitos infectados (68).

La técnica de RT-qPCR al ser una técnica con una alta sensibilidad, presenta un alto riesgo de contaminación cruzada entre muestras (52), por lo tanto, para reducir el riesgo de contaminación se deben respetar rigurosamente los protocolos propuestos en este trabajo. La técnica de RT-qPCR es una herramienta de diagnóstico con una alta sensibilidad en sus resultados, pero para asegurar la calidad de los mismos, debe ser desarrollada cuidadosamente desde la recepción de la muestra hasta su procesamiento,

con la finalidad de reducir al mínimo la presencia de falsos positivos y falsos negativos (57). El personal que será el encargado de llevar a cabo cada tarea debe seguir estricta y minuciosamente que las actividades se desarrollen en áreas separadas, el uso de materiales especiales, la limpieza y desinfección adecuada de las superficies y los materiales de trabajo (69).

Es importante que se tome en consideración todos los criterios para el control de la calidad de los resultados establecidos en esta propuesta (Tabla 06), debido a que la técnica RT-qPCR presenta una alta sensibilidad, lo cual la hace más susceptible a posibles contaminaciones como resultado de amplificaciones inespecíficas generando falsos positivos (52) o con la presencia de RNAsas que degraden el ARN viral generando falsos negativos (57). Por lo tanto, en el desarrollo de este trabajo se propone que cada proceso se desarrolle en ambientes separados (área de recepción de muestras, área de alicuotado, área de extracción y área de PCR), los materiales utilizados de darse la posibilidad deben ser esterilizados antes y después del desarrollo de la técnica mediante radiaciones ultravioleta (UV) o de lo contrario utilizando alcohol de 70% o hipoclorito de sodio al 1% (69). Así mismo, esta actividad debe ser desarrollada por personal capacitado con la formación profesional necesaria que pueda garantizar que los resultados obtenidos son los más idóneos y que su calidad esté garantizada. Cuando se trabaja con ARN es importante que el ácido nucleico extraído no sea almacenado durante periodos prolongados para evitar que se degrade, por lo tanto, las muestras deben de ser procesadas a la brevedad posible para garantizar la calidad de los resultados (44).

Una de las grandes ventajas que podemos obtener de la implementación de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue es la identificación de los serotipos circulantes en la región. Los resultados para la región Junín nos indican que durante el periodo de

septiembre del 2018 a agosto del 2021 se ha reportado la presencia de los serotipos DENV-1 y DENV-2 (Ver anexo 10). Sin embargo, no se puede descartar la circulación de los serotipos DENV-3 y DENV-4 debido a que en años anteriores han sido reportado casos clínicos provocados por estos serotipos (22).

Los resultados de la comparación entre las técnicas de diagnóstico ELISA NS1 y RT-qPCR nos mostraron que la sensibilidad era del 88.46%, esto corresponde a la proporción de pacientes que fueron correctamente diagnosticados con dengue mediante la prueba ELISA NS1 o también conocida como la proporción de verdaderos positivos. Este valor se encuentra dentro del rango de sensibilidad (85.8% - 94.8%) (36) reportado por el inserto de la marca ELISA PLATELIA™ DENGUE NS1 Ag (Ver tabla 01). La sensibilidad calculada en el presente trabajo nos indica que ante la posibilidad de que la prueba de ELISA NS1 sea positiva existe una alta probabilidad de que el paciente tenga dengue (70). Con respecto a la especificidad, los resultados nos mostraron que era del 87.23%, esto corresponde a la proporción de verdaderos negativos o los pacientes que, ante la ausencia de dengue, la prueba de ELISA NS1 resultó ser negativa. Este valor difiere del rango de especificidad (99.4% - 100%) reportado por el inserto de la marca ELISA PLATELIA™ DENGUE NS1 Ag (Ver tabla 01) (36). Los resultados del valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) nos mostraron la probabilidad de que un solo paciente presente o no la enfermedad (58). El valor del VPP fue del 83.63% lo cual nos indica la probabilidad de que un paciente realmente tenga dengue cuando el resultado de la prueba ELISA NS1 resulta ser positiva. Mientras que el valor de VPN fue del 91.11%, lo que nos indica la probabilidad de que un paciente no tenga dengue cuando el resultado de la prueba ELISA NS1 resulta ser negativo (70). Si comparamos estos resultados con otros estudios observamos que los resultados

encontrados en el presente estudio son similares a los reportados por Anand et. al (2016) donde calcularon que el VPP fue de 81.6% y el VPN de 88.9% (20). Sin embargo, difieren de los reportados por Ambrose et. al (2017) donde el VPP fue de 100% y el VPN de 58.3% (50) y por Wang & Sekaran (2010) donde el VPP fue de 99.30% y el VPN de 57.43% (71). El autor considera que la principal diferencia entre los resultados presentados en el presente trabajo y los resultados presentados por Ambrose et. al (2017) se debe al número de muestras utilizadas (21 muestras) para la comparación entre las técnicas de RT-qPCR y ELISA NS1. Mientras que para los resultados presentados por Wang & Sekaran (2010) la diferencia estaría provocada por la diferencia mostrada entre los kits ELISA NS1 disponibles en el mercado (Ver tabla 01), además del uso de sondas SYBR Green para el diagnóstico mediante RT-qPCR. Finalmente, para el valor de Odds ratio podemos decir que si son iguales a 1 esto nos indica que no hay diferencias entre las técnicas de diagnóstico. El valor obtenido para la Odds ratio diagnóstico fue de 1.12 lo cual nos indica que hay más probabilidad de que la prueba de ELISA NS1 sea positiva cuando el paciente tenga dengue (58).

Las técnicas de ELISA NS1 y RT-qPCR son técnicas de diagnóstico de las que se obtienen dos posibles resultados (binario). Si es positivo, podemos considerar la presencia de la enfermedad en el paciente y si resulta negativo, su ausencia. Para comparar los resultados de ambas técnicas se realizó el Test de diagnósticos binarios descrito por Delgado (2015) (60), donde la RT-qPCR fue considerada como la técnica “Gold estándar”. Los resultados obtenidos para la sensibilidad (88.46%) y especificidad (87.23%) fueron los mismos de los reportados previamente con un índice de confianza del 95%. Sin embargo, a diferencia de los resultados mostrados anteriormente, esta prueba también nos brinda el cálculo del error estándar para cada uno, siendo 0.94 para la sensibilidad y 0.81 para la especificidad.

Estos valores de error estándar nos indican que a medida que la cantidad de la población evaluada, con las técnicas de ELISA NS1 y RT-qPCR, sea más numerosa, mayor será la probabilidad de encontrar discordancias entre ambas técnicas lo cual se verá reflejado en una mayor proporción de falsos positivos y falsos negativos. Estos resultados sustentan la propuesta de que los resultados obtenidos mediante la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue va a mejorar su validez y confianza en comparación del diagnóstico mediante la técnica de ELISA NS1.

El diagnóstico de dengue puede realizarse utilizando varias técnicas como el aislamiento viral, la detección de antígenos (NS1, IgM e IgG), pruebas rápidas y mediante PCR, sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estas técnicas es variable. La prueba de RT-qPCR ha demostrado ser una alternativa confiable para la detección de pequeñas concentraciones de ARN viral en las muestras de suero humano (55), lo cual ha logrado que sea considerada como una herramienta valiosa para el diagnóstico del dengue y sus serotipos. Sin embargo, el uso de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue debe ser complementada con la técnica de ELISA IgM, debido a que el diagnóstico molecular solo está enfocado en detectar la enfermedad dentro de los primeros 5 días de presentar síntomas (etapa aguda o temprana) (31), pero en casos de pacientes con más de 5 días de síntomas, lo más probable es que no se pueda detectar el ARN del virus, pero sí los anticuerpos IgM, por lo que ambas técnicas deben ser consideradas para dar un diagnóstico definitivo.

Los protocolos descritos en los anexos 05, 06, 07 y 08 fueron elaborados para que sean considerados como una guía que muestre los pasos necesarios de cada proceso para la implementación de la técnica RT-qPCR para la detección de dengue en el Laboratorio referencial en muestras de suero humano. Los protocolos de recepción y alicuotado de

muestras fueron elaborados en base a los procedimientos actuales que son desarrollados en el en el Laboratorio Referencia de Salud Pública – DIRESA JUNÍN. El protocolo de extracción de ARN viral fue elaborado teniendo como referencia el kit de Mole Bioscience, sin embargo, este protocolo puede servir como referencia para ser modificado y aplicado con cualquier otro método de extracción que garantice la calidad del ARN extraído. Finalmente, el protocolo de la técnica RT-qPCR fue elaborado teniendo como referencia el uso del equipo CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) (72).

VIII. CONCLUSIONES

1. Las secuencias propuestas para el diagnóstico del dengue mediante la técnica de RT-qPCR para los serotipos con mayor prevalencia en la región Junín son: **DENV-1 F** GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT, **DENV-1 R** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC, **DENV-1 P** AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGAC ACGCG **DENV-2 F** AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA, **DENV-2 R** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC y **DENV-2 P** AGCATTCCAAGT GAGAATCTCTTTGTCAGCTGT.
2. La implementación de una técnica de diagnóstico requiere ser estandarizada, la cual puede resultar en un proceso complejo requiriendo controles externos e internos que garanticen la calidad de los resultados. La propuesta presentada busca ser una alternativa para la buena implementación de la técnica diagnóstico de dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.
3. Las condiciones mínimas para la operación de la técnica RT-qPCR fueron determinadas teniendo en consideración los equipos y la infraestructura disponibles. Se identificaron las entradas y salidas de cada proceso, el personal necesario para

cada etapa, los pasos necesarios para llevar a cabo cada actividad y finalmente se elaboró un esquema del proceso para el diagnóstico de dengue en el Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

4. Los criterios propuestos para asegurar la calidad de los resultados del diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR fueron establecer criterios de control de calidad para las muestras y criterios de control de calidad para cada proceso donde se propusieron controles y parámetros que el personal debe considerar al momento de desarrollar cada actividad.
5. La técnica RT-qPCR ha demostrado ser más sensible y específica que la técnica de ELISA NS1. De esta manera se considera importante su implementación como herramienta de diagnóstico molecular del virus dengue en el Laboratorio Referencia de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.

IX. RECOMENDACIONES

- El contexto actual del país ocasionado por la pandemia ha provocado que los distintos laboratorios descentralizados que existen en el país puedan implementar infraestructura y equipamiento para el diagnóstico molecular mediante la técnica de RT-qPCR de la COVID-19. Las autoridades de salud y el personal deben ser conscientes de la gran oportunidad de expandir la capacidad del Laboratorio Referencial de Salud Pública – DIRESA JUNÍN para el diagnóstico de otras enfermedades de salud pública como es el caso del dengue, aprovechando la infraestructura, los equipos, los conocimientos y la experiencia adquiridas durante este contexto de pandemia.

- Las secuencias de primers y sondas de los serotipos DENV-3 y DENV-4 deben ser probadas en muestras de pacientes provenientes de regiones donde haya prevalencia de estos serotipos.
- La inversión de tiempo para construir los protocolos para la estandarización y optimización de la técnica RT-qPCR para diagnóstico puede ser considerada como una desventaja, sin embargo, en esta propuesta se establecen los primeros pasos para su implementación exitosa en el Laboratorio Referencia de Salud Pública – DIRESA JUNÍN.
- El personal que va a realizar las actividades de diagnóstico debe ser consciente de los criterios propuestos para mantener la calidad de los resultados y que se encuentren conforme con los requisitos de mantener un buen sistema de diagnóstico. Como tener en cuenta que durante el desarrollo del proceso de RT-qPCR los controles internos y los controles positivos no deben ser agregados directamente a las muestras, debido a la presencia de potenciales contaminante o inhibidores como las RNAsas. Los materiales utilizados deben estar libres de RNAsas que puedan degradar el ARN del virus, alterando los resultados de las muestras y para que el ARN extraído sea de buena calidad Y otros parámetros de control de calidad propuestos en el presente trabajo.
- Finalmente, se recomienda a los egresados de la carrera de Biología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia que identifiquen problemas de índole profesional en sus centros laborales y busquen estrategias para su estudio y solución siguiendo el método científico, para que de esta forma pongan en práctica los conocimientos adquiridos durante su formación profesional.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thomas S, Endy T, Rothman A, Barrett A. 153 – *Flavivirus* (fiebre amarilla, dengue, fiebre del dengue hemorrágico, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis transmitida por garrapatas). In: Mandell, Douglas y Bennet Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica [Internet]. Novena edi. Barcelona, España: Elsevier España; 2021. p. 2013–39. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9788480868853001538>
2. Halstead S. Fiebre del dengue, fiebre hemorrágica por dengue y fengue grave. In: Nelson Tratado de pediatría. 21a Ed. Elsevier España; 2020. p. 1760–4.
3. García A, López J, Yoldi M, Dantés H, Mayo J. 305 - Infecciones víricas emergentes: fiebre amarilla, dengue, chikungunya, zika, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad por el virus del Ébola y otras virosis. Rabia [Internet]. 19na Ed. Farreras Rozman. Medicina Interna. Elsevier España; 2021. 2392–2404 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-84-9113-545-6/00305-7>
4. Dengue y dengue grave [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
5. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualización Epidemiológica: Dengue en el contexto de COVID-19 (3 de diciembre del 2020) [Internet]. Washington, D.C.; 2020. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53174>
6. Shepard D, Undurraga E, Halasa Y, Stanaway J. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(8):935–41.
7. Situación del dengue en el Perú – CDC MINSA [Internet]. [cited 2021 Oct 11].

Available from: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/subsistema-de-vigilancia/dengue/situacion-del-dengue-en-el-peru/>

8. Bernstein A. Climate Change and Infectious Disease. In: Jameson J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Loscalzo J, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018. Available from: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1159153291>
9. Organización Mundial de la Salud [OMS]. Respuesta mundial para el control de vectores 2017 - 2030 [Internet]. 2017. p. 4. Available from: http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf
10. Velandia M, Olano V, Coronel C, Cabezas L, Calderón M, Castellanos J, et al. Detección del virus del dengue en larvas y pupas de *Aedes aegypti* recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia . Vol. 37, Biomédica . scieloco ; 2017. p. 193–200.
11. Ministerio Nacional de Salud [MINSA] & Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades [CDC]. Vigilancia y control vectorial. Unidad temática N°4 [Internet]. 2017. 90 p. Available from: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/533179/resolucion-ministerial-288-2015-MINSA.pdf>
12. Organización Panamericana de la Salud. Estrategia para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales en las Americas [Internet]. Estrategia de gestión integrada para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales en las Américas. Washington, D.C.; 2019. 1–85 p. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51787>
13. Shepard D, Coudeville L, Halasa Y, Zambrano B, Dayan G. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):200–7.

14. Blackmore C. Dengue, Chikungunya, and Zika Virus. In: Boulton ML, Wallace RB, editors. *Maxcy-Rosenau-Last Public Health & Preventive Medicine*, 16e [Internet]. New York, NY: McGraw Hill; 2022. Available from: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1182667029>
15. Pliego E, Velázquez J, Fraguera A. Seasonality on the life cycle of *Aedes aegypti* mosquito and its statistical relation with dengue outbreaks. *Appl Math Model*. 2017 Oct 1;50:484–96.
16. Restrepo M, Botero D. *Parasitosis humanas* [Internet]. 6ta Ed. Fondo Editorial CIB; 2019. 1432 p. Available from: <https://elibro.net/es/lc/cayetano/titulos/186720>
17. Das B, Ghosal S, Mohanty S. *Aedes: What Do We Know about Them and What Can They Transmit?* *Vectors Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2019;(December).
18. Dwivedi V, Tripathi I, Tripathi R, Bharadwaj S, Mishra S. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Brief Funct Genomics* [Internet]. 2017 Jul 1;16(4):217–27. Available from: <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw040>
19. Gutiérrez L, Quintero D, Martínez M. Actualización en diagnóstico del dengue: evolución de las técnicas y su aplicación real en la clínica. *Med Lab*. 2012;18((09-10)):411–42.
20. Anand A, Sistla S, Dhodapkar R, Hamide A, Biswal N, Srinivasan B. Evaluation of NS1 Antigen Detection for Early Diagnosis of Dengue in a Tertiary Hospital in Southern India. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2016/04/01. 2016 Apr;10(4):DC01-DC4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27190798>
21. Uno N, Ross T. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 1;7(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0>
22. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud

- (OMS). Actualización Epidemiológica: Dengue y otras Arbovirosis [Internet]. Washington, D.C.; 2020. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-otras-arbovirosis-10-junio-2020>
23. Pardo D, Ojeda B, Alonso A. Dinámica de la respuesta inmune en la infección por virus del dengue. *MediSur*. 2018;16:76–84.
 24. Acerca del dengue: Lo que debe saber | Dengue | CDC [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/es/about/index.html>
 25. Langerak T, Mumtaz N, Tolk V, Van Gorp E, Martina B, Rockx B, et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLOS Pathog* [Internet]. 2019 Apr 18;15(4):e1007640. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007640>
 26. Dhanoa A, Hassan S, Ngim C, Lau C, Chan T, Adnan N, et al. Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):406. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1731-8>
 27. Diagnóstico | Dengue | CDC [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/diagnosis.html>
 28. Dengue - Chapter 4 - 2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/dengue#5160>
 29. Muraoka M, Tanoi Y, Tada T, Tabata A, Mizukoshi M, Kawaguchi O. Direct detection of Dengue viruses without extraction of RNA on the mobile real-time PCR device. *medRxiv* [Internet]. 2020 Jan 1;2020.11.04.20209635. Available from: <http://medrxiv.org/content/early/2020/11/06/2020.11.04.20209635.abstract>
 30. Suleman M, Faryal R, Alam MM, Sharif S, Shaukat S, Aamir UB, et al. NS1

- antigen: A new beam of light in the early diagnosis of dengue infection. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Dec 1;9(12):1212–4.
31. Mat Jusoh T, Shueb R. Performance Evaluation of Commercial Dengue Diagnostic Tests for Early Detection of Dengue in Clinical Samples. Dash AP, editor. *J Trop Med* [Internet]. 2017;2017:4687182. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/4687182>
 32. Raafat N, Blacksell S, Maude R. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 Nov 1;113(11):653–60. Available from: <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz068>
 33. Lindsey N, Staples E, Powell K, Rabe I, Fischer M, Powers A, et al. Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2021 Sep 28;56(1):e01115-17. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.01115-17>
 34. Yan G, Lee C, Lam L, Yan B, Chua Y, Lim A, et al. Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020;20(5):536. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30158-4)
 35. Mata V, Passos S, Hökerberg Y, Berardinelli G, Dos Santos M, Fukuoka L, et al. Accuracy and reliability of an NS1 rapid immunochromatographic test for DENV-1 diagnosis at point of care and in the laboratory. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2017;17(1):594. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2679-z>
 36. BIO-RAD. Platelia™ Dengue Ns1 Ag 96 Ensayos [Internet]. Marnes la Coquette, Francia: BIO-RAD; 2013. p. 1–32. Available from: [https://commerce.bio-d.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/72830_881040ES .pdf](https://commerce.bio-d.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/72830_881040ES.pdf)

37. InBios International. InBios - DENV Detect™ NS1 ELISA [Internet]. Seattle, WA: InBios International; 2018. p. 1–14. Available from: <http://inbios.com/wp-content/uploads/2016/05/LBL-0096-00-IVD-DENV-Detect-NS1-ELISA-Product-insert-Spanish.pdf>
38. Creative Diagnostics. Dengue NS1 Antigen ELISA Kit [Internet]. New York, NY: Creative Diagnostics; 2019. p. 1–4. Available from: <http://img2.creative-diagnostics.com/pdf/DEIABL14.pdf>
39. Focus Diagnostics. Dengue NS1 Antigen DxSelect™ [Internet]. California, US: Focus Diagnostics; 2016. p. 1–7. Available from: https://www.focusdx.com/pdfs/pi/OUS/EL1510_S.pdf
40. Abbott. Panbio Dengue Early ELISA | Análisis de diagnóstico inmediato [Internet]. [cited 2021 Oct 8]. Available from: <https://www.globalpointofcare.abbott/es/product-details/panbio-dengue-early-elisa.html>
41. EUROIMMUN. Dengue Virus NS1 ELISA [Internet]. Lübeck, Germany: EUROIMMUN; 2019. p. 1–2. Available from: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Dengue/EQ_266a_D_UK_A.pdf
42. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2004;22(5):299–305. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
43. Smith C, Osborn A. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2009 Jan 1;67(1):6–20. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
44. Aguilera P, Ruiz M, Rocha M, Pineda B, Chánez M. PCR en tiempo real. In: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* [Internet]. 1era Ed. Mexico; 2014. p. 175–202. Available from: <http://www2.inecc>

gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf

45. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba J, Andrade M. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods Mol Biol.* 2015;1275:vii.
46. Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. *J Virol Methods.* 2005 Oct 1;129(1):8–15.
47. Serrato A, Flores L, Aportela J, Sierra E. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. In: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos.* 1era ed. Mexico; 2014. p. 53–74.
48. El dengue y el COVID-19 | Dengue | CDC [Internet]. [cited 2021 Sep 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/es/is-it-dengue-or-covid.html>
49. Kembuan G. Dengue serology in Indonesian COVID-19 patients: Coinfection or serological overlap? *IDCases.* 2020 Jan 1;22:e00927.
50. Ambrose J, Sekaran S, Azizan A. Dengue Virus NS1 Protein as a Diagnostic Marker: Commercially Available ELISA and Comparison to qRT-PCR and Serological Diagnostic Assays Currently Used by the State of Florida. *J Trop Med.* 2017;2017.
51. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Sistema de alerta y respuesta temprana ante brotes de dengue: Guía operativa basada en el tablero de mandos en línea [Internet]. 2da Edició. Washington, D.C.; 2021. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53961>
52. Bolivar A, Rojas A, Lugo P. PCR y PCR-Multiple :parametros criticos y protocolo de estandarizacion. *Av Biomed Inst de Inmun Clín Mérida - Venezuela* [Internet]. 2014;3(1):25–33. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>

53. Peña V, Triana O, Mejía A, Díaz F, Gómez A, Arboleda S. Infection rates by dengue virus in mosquitoes and the influence of temperature may be related to different endemicity patterns in three Colombian cities. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(7):1–16.
54. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2323–30.
55. Conceição T, Da Poian A, Sorgine M. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods*. 2010 Jan;163(1):1–9.
56. Palomino M, Gutierrez V, Salas R. Estandarización del método de centrifugación en placa para el aislamiento del virus dengue. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(1):51–8.
57. Rys P, Persing D. Preventing False Positives : Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. 1993;31(9):2356–60.
58. Bravo S, Cruz P, Q J. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación Diagnostic accuracy studies: Tools for its Interpretation. *Rev Chil Radiol* año. 2015;21(4):158–64.
59. Vizcaino G. Importancia del calculo de la sensibilidad, especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnostico clínico y laboratorio. *Med y Lab [Internet]*. 2017;23(7–8):365–86. Available from: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883697/importancia-calculo-sensibilidad-y-es>

pecificidad.pdf

60. Antequera L. Evaluación y comparación de Test Diagnósticos Binarios. Universidad de Granada; 2015.
61. Agresti A, Coull BA. Approximate is Better than “Exact” for Interval Estimation of Binomial Proportions. *Am Stat* [Internet]. 1998 May 1;52(2):119–26. Available from: <https://doi.org/10.1080/00031305.1998.10480550>
62. Kerfeld C, Scott K. Using BLAST to Teach “E-value-tionary” Concepts. *PLOS Biol* [Internet]. 2011 Feb 1;9(2):e1001014. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001014>
63. Prada J, Castellanos J. Real time PCR. application in dengue studies. *Colomb Med*. 2011;42(2):243–58.
64. De la Fuente A, Romero D, Cárdenas O, Álvarez M. Diseño y evaluación de cebadores in silico del gen E1 del virus chikungunya para PCR en tiempo real (qPCR). *Rev CON-CIENCIA*. 2018;6(1):107–24.
65. Mun M, Bae J, Kim J, Kim S, Lee I, Kim J II, et al. One-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of dengue virus. *Mol Cell Probes*. 2019 Feb 1;43:86–91.
66. Waggoner J, Gresh L, Mohamed A, Ballesteros G, Vargas M, Tellez Y, et al. Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of zika, Chikungunya, and dengue viruses. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jul 1;22(7):1295–7.
67. Kim J, Hwang E. Multiplexed Diagnosis of Four Serotypes of Dengue Virus by Real-time RT-PCR. *Biochip J*. 2020 Dec 1;14(4):421–8.
68. Peña V, Triana O, Mejía A, Díaz F, Gómez A, Arboleda S. Infection rates by dengue virus in mosquitoes and the influence of temperature may be related to different endemicity patterns in three Colombian cities. *Int J Environ Res Public*

- Health. 2016;13(7):4–7.
69. Aslanzadeh J. Brief Review : Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory. 2004;34(4):389–96.
 70. Vizcaíno G. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. 28:365–86.
 71. Wang S, Sekaran S. Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection. J Clin Microbiol. 2010;48(8):2793–7.
 72. Bio-Rad Laboratories Inc. Sistema de detección CFX96™ mediante PCR en tiempo real [Internet]. California, US: Bio-Rad Laboratories, Inc.; 2010. Available from: https://www.altona-diagnostics.com/files/public/Content_Homepage/-_03_Biorad_CFX96/Biorad_CFX96_Manuals_and_Co/CFX96_IM_Spanish_ES_RevA.pdf
 73. Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5935–7.
 74. Wang W, Sung T, Tsai Y, Kao C, Chang S, King C. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4472–8.
 75. Callahan J, Wu S, Dion A, Mangold B, Peruski L, Watts D, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol. 2001;39(11):4119–24.
 76. García M. Serotipos circulantes, toma, conservación y procesamiento de muestra,

tipos de pruebas diagnosticas. Instituto Nacional de Salud; 2021.

77. Valencia E. Desarrollo y evaluación de un ensayo RT qPCR para la cuantificación y detección simultanea de los virus Chikungunya Dengue y Zika [Internet]. Universidad de La Salle; 2020. Available from: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1083&context=biologia>
78. Pei-Yun S, Shu-Fen C, Yu-Chung K, Yi-Yun Y, Li-Jung C, Chien-Lin S, et al. Development of Group- and Serotype-Specific One-Step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Jun 1;41(6):2408–16. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2408-2416.2003>
79. Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. *Arch Virol*. 2015 Jan 1;160(1):323–7.
80. Li-Jung C, Tsai-Ling L, Pei-Yun S, Jyh-Hsiung H, J. GD, J. CG-J. Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Apr 1;44(4):1295–304. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>

XI. ANEXOS

Anexo 01: Documento de aceptación de la DIRESA - JUNÍN



La Dirección Regional de Salud Junín con RUC N°: 20163688105 a través del Laboratorio Referencial de la Región Junín representado por el Biólogo Omar Álvaro Orellana Díaz, **AUTORIZA** a:

Don David Eduardo Severo Romero identificado con DNI: [REDACTED], Bachiller en Biología a realizar su Trabajo de suficiencia profesional titulado: "PROPUESTA DE IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA RT-qPCR PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR TEMPRANA DEL VIRUS DENGUE EN EL LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA – DIRESA JUNÍN", aceptando la investigación según la metodología y la aplicación de los instrumentos de recolección de datos expuestos en la propuesta.

Huancayo, 26 de noviembre del 2021



Dr. Omar Álvaro Orellana Díaz
DNI: [REDACTED]
Laboratorio Referencial de Salud Pública

Anexo 02: Resultado del análisis de las secuencias de *primers* mediante la herramienta BLAST

Ref.	Serotipo	Secuencia (5 → 3)	Región objetivo	Nt	Valor de E		Porcentaje de similitud		Cobertura		Coincidencia
					Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	
(54)	DENV	DENV F GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT	UTR 3'	23	0.003	0.050	94.7	100.0	82.2	82.2	DENV 1, 2, 3 y 4
		DENV R CATTCCATTTTCTGGCGTTC		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
		DENV R CAATCCATCTTGC GGCGCTC		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
(55)	DENV-1-3	DENV 1-3 F ATTAGAGAGCAGATCTCTG	UTR 5'	19	0.002	0.002	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
		DENV 1-3 R TCAATATGCTGAAACGCG		18	0.006	0.006	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2, 3 y 4
(73)	DENV	Dus F TCAATATGCTGAAACGCGCAGAAACCG	Gen C-PrM	28	$2e^{-8}$	$2e^{-8}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		Duc R TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTCC		29	$6e^{-9}$	$6e^{-9}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2, 3 y 4
	DENV-1	D1s F GGACTGCGTATGGAGTTTTG	Gen E-NS1	20	$5e^{-4}$	0.008	100.0	100.0	90.0	100.0	DENV 1 y 3
		D1c R ATGGGTTGTGGCCTAATCAT		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-2	D2s F GTTCCTCTGCAAACACTCCA	Gen E	20	$5e^{-4}$	0.12	95.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
		D2c R GTGTTATTTTGATTTCCCTTG		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	D3s F GTGCTTACACAGCCCTATTT	Gen E-NS1	20	$5e^{-4}$	0.031	94.7	100.0	95.0	100.0	DENV 3
		D3s R TCCATTCTCCCAAGCGCCTG		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 3
	DENV-4	D4s F CCATTATGGCTGTGTTGTTT	NS2a-NS2b	20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
		D4s R CTTCATCCTGCTTCACTTCT		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
	DENV-1	D1MGBEn469s F GAACATGGRACAAYTGCAACYAT	Gen E	23	0.006	0.006	86.9	86.9	100.0	100.0	DENV 1
		D1MGBEn536r R CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTCA		24	$4e^{-4}$	$4e^{-4}$	95.6	95.6	95.0	95.0	DENV 1
	DENV-2	D2MGBEn493s F ACACCACAGAGTCCATCACAGA		23	$1e^{-5}$	$1e^{-5}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
		D2MGBEn568r R CATCTCATTGAAGTCNAGGCC		21	0.009	0.009	95.2	95.2	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	D3MGBEn1s F ATGAGATGYGTGGGAGTRGAAAC		24	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	91.6	91.6	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		D3MGBEn71r R CACCACDTCAACCCACGTAGCT		22	0.001	0.001	95.4	95.4	100.0	100.0	DENV 3
DENV-4 (a)	D4TEEn711s F GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	22		-	-	-	-	-	-	-	-
	D4TEEn786c R WGARTGCATRGCTCCYTCCTG	21		-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 02: Resultado del análisis de las secuencias de *primers* mediante la herramienta BLAST (Continuación)

Ref.	Serotipo	Secuencia (5 → 3)	Región objetivo	Nt	Valor de E		Porcentaje de similitud		Cobertura		Coincidencia
					Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx	
(74)	DENV-2	DENV 2 F GCTGAAACGCGAGAGAAACC	Gen C	20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
		DENV 2 R CAGTTTTAITGGTCTCGTCCCT		22	0.68	0.68	95.6	100.0	68.0	100.0	DENV 2 y 4
(75)	DENV-1	DENV 1 F GACACCACACCCTTTGGACAA	Gen NS5	21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		DENV 1 R CACCTGGCTGTCACTCCAT		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-2	DENV 2 F CATGGCCCTKGTGGCG	Gen C	16	0.34	0.34	93.7	93.7	100.0	100.0	DENV 2
		DENV 2 R CCCATCTYTTCAGTATCCCTG		22	$3e^{-4}$	$3e^{-4}$	95.4	95.4	100.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV-3	DENV 3 F GGGAAAACCGTCTATCAATA		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		DENV 3 R CGCCATAACCAATTTATTGG		21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
(75)	DENV-4	DENV 4 F TGAAGAGATTCTCAACCGGAC	Gen C	21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 4
		DENV 4 R AATCCCTGCTGTTGGTGGG		19	0.002	0.002	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV	DENV F AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC	UTR 3'	25	$7e^{-6}$	$7e^{-6}$	96.0	96.0	100.0	100.0	DENV 1, 2, 3 y 4
		DENV R GCGYTCTGTGCCTGGAWTGATG		23	$7e^{-4}$	$7e^{-4}$	91.3	91.3	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
(76)	DENV-1	DENV 1 F CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	Gen E	20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1
		DENV 1 R CTGAGTGAATTCTCTACTGAACC		25	$1e^{-6}$	$2e^{-5}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1
	DENV-2	DENV 2 F CAGGTTATGGCACTGTCACGAT		22	$5e^{-5}$	0.003	100.0	100.0	86.0	100.0	DENV 2
		DENV 2 R CCATCTGCAGCAACCATCTC		22	$5e^{-5}$	$5e^{-5}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 F GGACTGGACACACGCACTCA		20	$5e^{-4}$	0.031	100.0	100.0	85.0	100.0	DENV 3
		DENV 3 F CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT		26	$3e^{-7}$	$5e^{-6}$	96.1	100.0	100.0	100.0	DENV 3
	DENV 4	DENV 4 F TTGTCCTAATGATGCTGGTTCG		21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
		DENV 4 R TCCACCTGAGACTCCTTCCA		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
(67)	DENV-1-4	DENV-1-4 F AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA	UTR 5' – Gen C	26	$3e^{-7}$	$3e^{-7}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
		DENV-1-4 F TCTGGAAAAATGAACCAACGAA		22	$5e^{-5}$	$5e^{-5}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
		DENV-1-4 R CGGTTTCTCTCGCGTTTCAG		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
(65)	DENV-1	DENV 1 F1 GYTTCCCTGTGAGCCATTGTGAA	Gen NS5	22	$3e^{-4}$	$3e^{-4}$	100.0	100.0	90.0	90.0	DENV 1 y 3
		DENV 1 F2 GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT		28	$1e^{-7}$	$1e^{-7}$	96.4	96.4	100.0	100.0	DENV 1
		DENV 1 R1 GAAACCAATACATTTTCATGAGTAGAATT		29	$6e^{-9}$	$6e^{-9}$	100.0	100.0	88.0	100.0	DENV 1

Anexo 02: Resultado del análisis de las secuencias de *primers* mediante la herramienta BLAST (Continuación)

Ref.	Serotipo	Secuencia (5 → 3)	Región objetivo	Nt	Valor de E		Porcentaje de similitud		Cobertura		Coincidencia
					Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx	
(65)	DENV-1	DENV 1 R2 TACATTTTCATGRGTRGAATTTCTTGAG	Gen NS5	27	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	92.5	92.5	100.0	100.0	DENV 1
	DENV 2	DENV 2 F TGCCCAACACAAGGRGAACC	Gen E	20	0.004	0.004	95.0	95.0	100.0	100.0	DENV 2
		DENV 2 R GRCAGGTCACAATGCCYCC		20	0.032	0.032	90.0	90.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 F CGGGAAAACCGTCTATCAATATGC	Gen C	24	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		DENV 3 R TGAGAATCTCTCGCCAACTGTG		23	$1e^{-5}$	$1e^{-5}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 F GGTGAAGAGATTCTCRACYGGACT		24	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	91.6	91.6	100.0	100.0	DENV 4
DENV 4 R TGCTGTTGGYGGGATGGAAA		20		0.004	0.004	95.0	95.0	100.0	100.0	DENV 4	
(77)	DENV-1-4	DENV 1-4 F TGTACGCACGGGGTAGCAGACT	UTR 3'	22	$5e^{-5}$	0.011	95.45	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
		DENV 1-4 R TGTGCCTGGAATGATGCTGHRGAG		24	$8e^{-4}$	$8e^{-4}$	100.0	100.0	79.0	79.0	DENV 1, 2 y 3
(78)	DENV1-4	DENV 1-4 F CAATATGCTGAAACGCGAGAGAAA	Gen C	24	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
		DENV 1-4 R CCCCATCTATTCAGAATCCCTGCT		24	0.001	$6e^{-5}$	95.8	100.0	91.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV-1	DENV 1 R CGCTCCATACATCTTGAATGAG		22	2.7	2.7	90.9	90.9	100.0	100.0	DENV 1
	DENV-2	DENV 2 R AAGACATTGATGGCTTTTGA		20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV 3	DENV 3 R AAGACGTAAATAGCCCCCGAC		21	9.1	9.1	100.0	100.0	61.0	61.0	DENV 1 y 3
	DENV 4	DENV 4 R AGGACTCGCAAAAACGTGATGAAT		24	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
(79)	DENV 1-3	DENV1-3 F GARAGACCAGAGATCCTGCTGTCT	NS2a	24	$2e^{-5}$	$2e^{-5}$	95.8	95.8	100.0	100.0	DENV 1, 2, 3 y 4
		DENV1-3 R ACCATTCCATTTTCTGGCGTT		21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
	DENV 4	DENV-4 F AAGCCAGGAGGAAGCTGTACTCCT		24	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
		DENV-4 R CAATCCATCTTGCGGCGCTCT		21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4

(a) Las secuencias de primers no mostraron ningún resultado.

Anexo 03: Resultado del análisis de las secuencias de sondas TaqMan® mediante la herramienta BLAST

Ref.	Serotipo	Secuencia (5 → 3)	Región objetivo	Nt	Valor de E		Porcentaje de similitud		Cobertura		Coincidencia
					Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx	
(54)	DENV	DENV P CAGCATCATTCCAGGCACAG	UTR 3'	20	$5e^{-4}$	$5e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
(55)	DENV-1-3	DENV 1-3 P TGACACGCGGTTTC	UTR 5'	14	0.77	0.77	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 2
60)	DENV-1	D1MGBEn493p P ACACCTCAAGCTCC	Gen E	14	0.77	0.77	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1
	DENV-2	D2MGBEn545p P CGATGGARTGCTCTC		15	1.4	1.4	93.3	93.3	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	D3MGBEn27p P AGATTTTGTGGAAGGYCT		18	0.043	0.043	94.4	94.4	100.0	100.0	DENV 3
(74)	DENV-2	DENV 2 P AGCATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGCTGT	Gen C	33	$3e^{-10}$	$3e^{-10}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
(62)	DENV-1	DENV 1 P AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAAGTTGACACGCG	Gen NS5	31	$3e^{-9}$	$3e^{-9}$	100.0	100.0	93.0	100	DENV 1 y 3
	DENV-2	DENV 2 P TCCTTCGTTTCCTAACAAATCC	Gen C	21	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV-3	DENV 3 P CACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGA		29	$6e^{-9}$	$6e^{-9}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 P TCATCACGTTTTTGGCAGTCTTTCCA		27	$8e^{-8}$	$8e^{-8}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
	DENV-1-3	DENV 1-3 P AACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACC	UTR 3'	29	$4e^{-8}$	$4e^{-8}$	100.0	100.0	93.0	93.0	DENV 1, 2 y 3
	DENV-2-4	DENV 2-4 P AACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACC	UTR 3'	27	$8e^{-8}$	$8e^{-8}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2 y 4
(76)	DENV-1	DENV 1 P CATGTGGTTGGGAGCACGC	Gen E	23	$3e^{-4}$	$3e^{-4}$	100.0	100.0	82.0	82.0	DENV 1
	DENV-2	DENV 2 P CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTCAA		27	$8e^{-8}$	$1e^{-6}$	96.3	100.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 P ACCTGGATGTGGTGAAGGAGCTTG		26	$3e^{-7}$	$3e^{-7}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 P TCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG		26	$3e^{-7}$	$3e^{-7}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
64)	DENV-1	DENV 1 P ACGGCTCGACCGTCT	UTR 5' – Gen C	15	0.20	0.20	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1
	DENV-2	DENV 2 P AGGCGAGAAATACGC		15	0.20	0.20	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 P ACGGAAAACCGTCTAT		17	0.019	0.019	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 P TCAGACCACCTTCAAT		17	0.019	0.29	100.0	100.0	88.0	100.0	DENV 2 y 4
(65)	DENV-1	DENV 1 P ACTGCGYACACAATRTTCTGTCCACAT	Gen NS5	31	$2e^{-8}$	$2e^{-8}$	93.5	93.5	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-2	DENV 2 P TGGTRGACAGAGGATGGGGAATGGAT	Gen E	27	$4e^{-6}$	$4e^{-6}$	92.5	92.5	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 P AACGCGTGAGAAAACCGTGTGTCAACTG	Gen C	27	$8e^{-8}$	$8e^{-8}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 P TCYGGGAAAGGACCCTTACGGATGGTG		27	$5e^{-7}$	$5e^{-7}$	96.3	96.3	100.0	100.0	DENV 4

Anexo 03: Resultado del análisis de las secuencias de sondas TaqMan® mediante la herramienta BLAST (Continuación)

Ref.	Serotipo	Secuencia (5 → 3)	Región objetivo	Nt	Valor de E		Porcentaje de similitud		Cobertura		Coincidencia
					Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	
(77)	DENV-1-4	DENV 1-4 P GCATATTGACGCTGGGARAGA	UTR 3'	25	$2e^{-4}$	$2e^{-4}$	95.24	95.2	84.0	84.0	DENV 1, 2, 3 y 4
(80)	DENV-1	DENV 1 P TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGG	Gen NS5	28	$2e^{-8}$	$2e^{-8}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-2	DENV 2 P AAGAGACGTGAGCAGGAAGGAAGGGGGAGC		30	$2e^{-9}$	$4e^{-7}$	96.7	100.0	100.0	100.0	DENV 2
	DENV-3	DENV 3 P TGAGAGATATTTCCAAGATACCCGGAGGAG		30	$2e^{-9}$	$4e^{-7}$	96.7	100.0	93.0	100.0	DENV 1 y 3
	DENV-4	DENV 4 P TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC		30	$2e^{-9}$	$2e^{-9}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4
(79)	DENV-1-3	DENV1-3 P AGCATCATTCCAGGCAC	NS2a	17	0.019	0.019	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 1, 2 y 3
	DENV-4	DENV-4 P CTGTCTCTGCAACATCAATCCAGGCA		26	$3e^{-7}$	$3e^{-7}$	100.0	100.0	100.0	100.0	DENV 4

Anexo 04: Protocolo de estandarización del procedimiento para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-QPCR

a. Fundamento del método:

La cuantificación de estas secuencias se realiza en tiempo real, calculando la cantidad de amplicones generados durante cada ciclo de replicación mediante la detección de la señal fluorescente que se genera en cada reacción y la que es proporcional a la cantidad de ARN viral que se encuentre en la muestra (63). Para validar los ensayos realizados por la técnica qPCR, es necesario conocer la eficiencia de la amplificación. Esta se calcula mediante la curva generada por el resultado de las diluciones seriadas de una muestra que contenga una cantidad estándar del material genético de interés. El valor del Ct sirve como indicador para calcular el número inicial de cadenas de ADNc en la muestra. Mientras mayor sea la carga viral, menor serán los ciclos necesarios para alcanzar el umbral de detección. El presente protocolo se elaboró tomando como base los protocolos descritos por Conceição et. al 2010 (55) y Palomino et. al 2010 (56).

b. Condiciones previas

- Las cepas de virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y las líneas celulares (C6/36HT ATCC) fueron donadas por el INS.
- Se tomó una alícuota de la muestra (250 μ l) y se almacenó el resto en refrigeración (2-8°C).
- Las muestras que presentaban contaminación no fueron consideradas.
- Para preparar el stock de virus, las células C6/36HT deben ser infectadas por cada serotipo de DENV.

- La prueba para la detección lineal de la zona objetivo debe ser desarrollada diluyendo la muestra de referencia diez veces en un rango de 1 a 10 copias por triplicado de acuerdo con el protocolo del equipo CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA).
- El procedimiento será desarrollado utilizando los equipos de protección personal adecuados, dentro de una cabina de bioseguridad.

c. Equipos requeridos

- Equipo de qPCR en tiempo real:
 - CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)
- Agitador para tubos de laboratorio mecánico, cabina de bioseguridad, centrífuga, racks para tubos de microcentrífuga, micropipetas (10 μ l, 200 μ l y 1000 μ l), computadora con el software del equipo de qPCR (Bio rad CFX Manager), microscopio de fluorescencia.

d. Insumos requeridos:

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga con tapa a presión (1.5 ml) libres de RNAsas, tips con filtro libres de RNAsas (10 μ l y 200 μ l), placa de PCR de 200 μ l (96 pocillos), placa de cultivo celular (24 pocillos), racks para tubos de PCR, film adhesivo transparente de calidad óptica, guantes de nitrilo descartables, envase para hielo, juego de pipetas y micropipetas.
- **Reactivos:** Medio mínimo esencial Eagle (EMEM), muestras de suero humano proveniente de pacientes en fase aguda de la enfermedad (2ml).
- **Cepas de virus:** DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4 aisladas de pacientes en fase aguda de la enfermedad.

- **Células para aislamiento:** Células C6/36HT ATCC de *Aedes albopictus*
- **Medio de cultivo celular:** Medio mínimo esencial con sales de Earle's (EMEM)

e. Procedimiento:

A continuación, se describe el protocolo de estandarización del procedimiento para el diagnóstico de dengue mediante la técnica RT-qPCR:

- **Cultivo en células C6/36HT:**
 - o Agregar 9.4 gr de EMEM en 939 ml de agua destilada.
 - o Agregar 10 ml de aminoácidos, 1 ml de nistatina y 50 ml de suero bovino fetal.
 - o Agitar hasta disolver completamente.
 - o Ajustar el pH a 7.2.
 - o Sembrar las células C6/36HT de *Aedes albopictus* en una placa de cultivo celular (24 pocillos) que contienen EMEM
 - o Agregar a cada pocillo 2×10^5 células/ml/pocillo.
 - o Incubar a 37 °C por 48 horas.
 - o Eliminar el medio de crecimiento con una pipeta de 10 ml.
 - o Agregar 1 ml de medio MM (2% suero bovino fetal).
 - o Centrifugar durante 30 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente.
 - o Inocular las células C6/36HT con cada serotipo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4).
 - o Incubar a 33 °C por 7 a 10 días.
 - o Identificar las cepas virales mediante IFI
- **Diluciones**

- o Seleccionar tres muestras positivas para cada serotipo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4).
 - o Tomar 5 µl de ARN extraído y mezclar con 45 µl de agua de grado molecular.
 - o Diluir las muestras con las siguientes concentraciones: 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000; 1/50000 y 1/100000.
 - o Inocular en 200 µl de cada dilución en tubos de centrifuga.
 - o Los controles solo contendrán MM (2% de suero bovino fetal).
 - o Centrifugar las muestras por 30 minutos a 2000 rpm.
 - o Incubar por 30 minutos.
 - o Aspirar el sobrenadante.
 - o Agregar 1 ml de MM.
 - o Incubar a 33 °C por 7 a 10 días.
 - o Identificar las cepas virales mediante IFI
- **Elección de primers y sondas**
 - o Los primers y las sondas que serán utilizados son los propuestos en la tabla 04 y 05.
- **Extracción de ARN viral**
 - o Los pasos para la extracción de ARN son descritos en el protocolo 06.
- **RT-qPCR**
 - o Los pasos para desarrollar la técnica RT-qPCR son descritos en el protocolo 07.
- **Curva estándar**

- o Preparar una mezcla para cada punto de la curva de calibración (diluciones), para que de esta forma se pueda evaluar en diferentes concentraciones.
- o Establecer el punto de detección (en base a la detección del ARN viral a bajas concentraciones) con el menor número de copias.

- **Análisis de los datos**
 - o Exportar los datos recopilados hacia una hoja de cálculo en Excel (Microsoft Excel ® versión 2016).
 - o Seleccionar el umbral y la línea base para generar la curva de calibración.
 - o Realizar la regresión lineal con los puntos de la curva (un punto por cada dilución que resulte positiva).
 - o Una vez que se cuente con la curva de regresión, calcular los valores de ciclo umbral (Ct) para las muestras positivas.
 - o Determinar el número de ciclo en que la primera curva de amplificación cruza el umbral y establecer la línea base tres ciclos antes de este punto.
 - o Calcular la concentración en porcentaje.

f. Tratamiento y obtención de resultados.

Los valores del Ct obtenidos mediante la prueba RT-qPCR para las concentraciones conocidas deben ser graficadas comparándolas con el logaritmo del número de copias del ADNc. La curva resultante servirá para determinar el número de copias equivalentes del DENV encontrados en las muestras experimentales, además permitirá calcular la eficiencia de la reacción.

Anexo 05: Protocolo de recepción y codificación de muestras

a. Fundamento

El área de recepción de muestras es la encargada de verificar que las condiciones de transporte de las muestras y la documentación que la acompaña sean las correctas. Además, es el área encargada de codificar las muestras y derivarlas al área correspondiente para ser procesadas de acuerdo a la información consignada en la ficha epidemiológica. Las muestras de suero humano obtenidas para el análisis mediante la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue provienen de las redes de salud de Chanchamayo, Pichanaki, Satipo y Pangoa, así como de otros establecimientos que no se encuentren en zonas endémicas.

b. Tipo de muestra

- Suero humano (2 ml)

c. Condiciones previas

- Los criterios de inclusión para la aceptación de las muestras:
 - o Muestras de pacientes que vivan o hayan estado de visita las últimas dos semanas en zonas endémicas donde se reporte la presencia de esta enfermedad.
 - o La ficha epidemiológica debe consignar los síntomas del paciente que hagan sospechar de la enfermedad, en especial los signos de alarma.
 - o Los viales con las muestras de suero humano deben contener una cantidad mínima de 2 ml para su procesamiento.

- Los criterios de exclusión de las muestras:
 - o El tiempo entre el inicio de los síntomas y la toma de muestra no supere los 5 días.
 - o La temperatura interior del contenedor que trae las muestras no se encuentre fuera del rango de temperatura entre los 2°C y 8°C.
 - o El recipiente para el transporte de las muestras, así como su embalaje y protección no son los adecuados.

d. Procedimiento

A continuación, se describe el protocolo de recepción y codificación de muestras para el diagnóstico de dengue.

- Verificar que las muestras provenientes de los distintos establecimientos de salud de la región Junín cuenten con lo siguiente:
 - o Oficio dirigido al Laboratorio referencial firmado por la autoridad responsable del establecimiento de salud que solicita el diagnóstico.
 - o Ficha epidemiológica correctamente llenada (nombre del establecimiento, información completa del paciente, fecha de inicio de síntomas, fecha de toma de muestra, sello del personal de salud solicitante).
- Desinfectar con hipoclorito de sodio al 1% los empaques y todas las superficies de las muestras.
- Verificar que las condiciones de transporte sean las correctas:
 - o Recipiente primario en buen estado y sin derrames.
 - o La temperatura debe encontrarse entre 2°C y 8°C.

- o Muestras estén correctamente rotuladas (apellidos y nombres, fecha de toma de muestra y su procedencia).
- Luego de verificar la conformidad de la documentación, las condiciones de envío y las muestras ingresar la información de cada muestra en la cadena de custodia (base de datos).
- Asignar un código de recepción.
- Preservar las muestras a -20°C hasta su uso.

Anexo 06: Protocolo de alicuotado de muestras

a. Fundamento

Es importante la preparación de alícuotas de las muestras para que estas no sean congeladas y descongeladas repetidas veces, debido a que puede provocar que el material genético del DENV se degrade, alterando los resultados. Una vez que se obtiene una alícuota, esta puede ser almacenada en congelación durante periodos más prolongados. La muestra sobrante puede ser almacenada en caso se necesite que el proceso de extracción o de RT-qPCR sea repetido o para que pueda ser distribuida hacia otros laboratorios para que pase un control de calidad, sea procesada por otro método de diagnóstico o descartar otras posibles enfermedades.

b. Tipo de muestra

- Suero humano (2 ml)

c. Condiciones previas

- La persona encargada de desarrollar esta actividad debe corroborar que los datos de la ficha epidemiológica, la muestra y el código asignado sean los correctos.
- Los materiales que serán utilizados deberán ser esterilizados con luz UV por diez minutos.
- El procedimiento será desarrollado utilizando los equipos de protección personal adecuados, dentro de una cabina de bioseguridad.

d. Equipos requeridos:

- Cabina de bioseguridad, micropipetas de 200 μ l y 1000 μ l, tubos.

e. Insumos requeridos:

- **Materiales:** Tubos colectores libres de RNAsas (24 unidades), tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con tapa a presión libres de RNAsas (24 unidades), tips con filtro libres de RNAsas (200 μ l y 1000 μ l), racks para tubos de microcentrífuga, guantes de nitrilo descartables.
- **Reactivos:** Agua de grado molecular, muestras de suero (2 ml).

f. Procedimiento:

A continuación, se describe el protocolo de alicuotado de muestras.

- Colocar todos los materiales que serán utilizados dentro de la cabina de bioseguridad.
- Extraer una alícuota de 250 μ l de la muestra en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
- Las muestras serán realizadas por duplicado.
- Armar un panel con las muestras alicuotadas (44 muestras)
- La última muestra está constituida por agua de grado molecular para ser utilizada como control de alicuotado.
- Almacenar las alícuotas temporalmente entre 2C° y 8C° hasta que se inicie la extracción de ARN viral.

Anexo 07: Protocolo de extracción del ARN viral

a. Fundamento de la técnica:

Esta enfermedad es ocasionada por un virus esférico de ARN de cadena simple de sentido positivo. Para realizar el diagnóstico del virus del dengue mediante la técnica de RT-qPCR es necesario extraer este ARN de las muestras de suero usando un kit de extracción viral manual por medio de columnas de sílice (Mole Bioscience, Taizhou, China). Los kits utilizan principalmente el tiocianato de guanidinio como solución de lisis para liberar el ARN del virus en la muestra, posteriormente el ARN es absorbido por una membrana de sílica gel y liberada mediante los buffers de lavado y el buffer de elución. El ARN purificado posteriormente es utilizado para su transcripción inversa y amplificación mediante la técnica RT-qPCR.

b. Tipo de muestra:

Los kits utilizados para obtener la información genética del virus funcionan en una variedad de muestras como heces, esputo, suero, plasma, etc. Sin embargo, las muestras de los pacientes que llegan al Laboratorio referencial son suero humano, por lo tanto, esta será la muestra utilizada para la extracción del ARN.

c. Condiciones previas:

- Los materiales que serán utilizados deberán ser esterilizados con luz UV por diez minutos.
- El procedimiento será desarrollado utilizando los equipos de protección personal adecuados, dentro de una cabina de bioseguridad.

d. Equipos requeridos:

- Agitador de tubos de laboratorio mecánico, cabina de bioseguridad, centrífuga, baño maría para laboratorio, micropipetas de 200 μ l y 1000 μ l.

e. Insumos requeridos:

- **Materiales:** Buffer de lisis (5 ml), buffer de lavado A (6.5 ml), buffer de lavado B (9 ml), buffer de elución (5ml), columnas de extracción (Mole Bioscience, Taizhou, China) (24 unidades), tubos colectores libres de RNAsas (24 unidades), tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con tapa a presión libres de RNAsas (24 unidades), tips con filtro libres de RNAsas (200 μ l y 1000 μ l), racks para tubos de microcentrífuga, guantes de nitrilo descartables.
- **Reactivos:** Etanol absoluto (96% – 100%), agua de grado molecular, muestras de suero (250 μ l).

f. Procedimiento:

A continuación, se describe el protocolo de extracción del ARN viral utilizando el Kit de extracción manual (Mole Bioscience, Taizhou, China) para 24 muestras:

- Agregar 6.5 ml de etanol absoluto al buffer de lavado A y 18 ml al buffer de lavado B. Mezclar invirtiendo los recipientes 6 veces y reservarlas aparte.
- Programar la centrífuga en 25°C.
- En los tubos de microcentrífuga agregar 200 μ l de buffer de lisis y 200 μ l de muestra. Mezclar en un agitador de tubos entre 10 a 15 segundos e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

- Colocar la columna de extracción de ácidos nucleicos en un tubo colector, agregar la mezcla dentro de la columna y centrifugar por 30 segundos a 12000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector.
- Agregar 500 µl de buffer de lavado A (1:1) dentro de la columna y centrifugar por 30 segundos a 12000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector.
- Agregar 450 µl de buffer de lavado B (1:2) dentro de la columna y centrifugar por 30 segundos a 12000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector.
- Repetir el paso anterior.
- Centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm para remover completamente la solución de lavado.
- Descartar el tubo colector y colocar la columna de ácidos nucleicos en un tubo de microcentrífuga.
- Agregar 100 µl de buffer de elución dentro de la columna, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm.
- Descartar la columna de extracción
- Almacenar el ácido nucleico extraído temporalmente entre 2C° y 8C° hasta su procesamiento mediante la prueba de PCR.
- La última muestra está constituida por agua de grado molecular para ser utilizada como control de extracción.

Anexo 08: Protocolo de la técnica RT-qPCR para el diagnóstico de dengue

a. Fundamento de la técnica:

El diagnóstico por las técnicas moleculares permite la secuenciación de zonas específicas en el genoma del virus que sirve como herramienta para detectar los distintos serotipos, mediante el análisis de las curvas de punto de fusión (T_m) (19,46). La técnica de RT-qPCR es una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real que busca la detección del material genético del DENV en una muestra de suero. En la actualidad, esta es la técnica con mayor sensibilidad para la detectar ácidos nucleicos (ARN). El ARN extraído es transcrito de forma inversa en una cadena de cADN que posteriormente es amplificada múltiples veces. La qPCR funciona de la misma manera que un PCR convencional, con fases de desnaturalización, hibridación y amplificación, dando como resultado múltiples copias del material genético del DENV, las cuales son registradas “en tiempo real” mediante la detección de las señales fluorescentes que se emiten en cada amplificación (43). Si se encuentra la presencia del ARN del DENV en la muestra, la RT la convertirá en una cadena de ADNc, luego los primers amplificarán ciertas secuencias que codifican ciertas proteínas de interés y por la fluorescencia emitida se determina si la muestra es positiva o negativa.

b. Consideraciones previas

- Los materiales que serán utilizados deberán ser esterilizados con luz UV por diez minutos.
- El procedimiento será desarrollado utilizando los equipos de protección personal adecuados, dentro de una cabina de bioseguridad.

- El total del panel de qPCR (96 pocillos) tuvo los siguientes controles:
 - o **Alicuotado de muestras**
 - **Control de alicuotado:** Compuesto por agua de grado molecular en reemplazo de la muestra.
 - o **Extracción de ARN**
 - **Control de extracción:** Compuesto por agua de grado molecular en reemplazo de la muestra.
 - o **RT-qPCR**
 - **Control interno:** Compuesto por una cadena de ARN conocida no tiene ninguna homología que permita su unión con ninguna cadena humana. Es agregada al buffer de lisis de ARN para su purificación, transcripción y posterior amplificación junto con la muestra de ARN viral. Debe ser agregado a todas las muestras y también al control positivo.
 - **Control positivo:** Compuesto por un fragmento de ARN del virus, que permita su adherencia a los primers para su posterior amplificación y muestre un resultado positivo. Este control debe ser procesado a la par de las otras muestras.
 - **Control negativo:** Compuesto por todos los reactivos con excepción del ARN viral.
- El ARN extraído fue mantenido en hielo o refrigerados hasta que sean colocados en las placas de PCR.
- Se debe evitar la sobrexposición a la luz directa de las muestras y de los reactivos.
- La finalidad de cada control se encuentra detallada en la tabla 05.

c. Equipos requeridos:

- Equipo de qPCR en tiempo real:
 - CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)
- Agitador para tubos de laboratorio mecánico, cabina de bioseguridad, centrífuga, racks para tubos de microcentrífuga, micropipetas (10 µl, 200 µl y 1000 µl), computadora con el software del equipo de qPCR (Bio rad CFX Manager).

d. Insumos requeridos:

- **Materiales:** Tubos de microcentrífuga con tapa a presión (1.5 ml) libres de RNasas, tips con filtro libres de RNasas (10 µl y 200 µl), placa de PCR de 200 µl (96 pocillos), racks para tubos de PCR, film adhesivo transparente de calidad óptica, guantes de nitrilo descartables, envase para hielo.
- **Reactivos:** Agua de grado molecular, TaqMan® universal master mix (Applied Biosystems™, California, Estados Unidos), muestras de ARN extraído
- **Primers:**
 - **DENV-1:**
 - **Forward** GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT
 - **Reverse** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
 - **DENV-2:**
 - **Forward** AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAA
 - **Reverse** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
 - **DENV-3:**
 - **Forward** AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC
 - **Reverse** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC
 - **DENV-4:**
 - **Forward** AAGCCAGGAGGAAGCTGTACTCCT

- **Reverse** TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
- **Sondas TaqMan®:**
 - **DENV-1:**
 - (**FAM**) AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCG (BHQ-1)
 - **DENV-2:**
 - (**HEX**) AGCATTCCAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGCTGT (BHQ-1)
 - **DENV-3:**
 - (**TxRed**) CACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAGGA (BHQ-2)
 - **DENV-4:**
 - (**Cy5**) TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC (BHQ-3)

e. Procedimiento

A continuación, se describe el protocolo de procesamiento de las muestras para su diagnóstico mediante RT-qPCR utilizando el equipo CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA):

- **Preparación del Master mix (1x):**
 - Descongelar los reactivos pipeteando varias veces o moviendo suavemente los tubos de microcentrífuga.
 - En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, agregar 12.5 µl de TaqMan® Universal PCR Master mix, 0.6 µl de transcriptasa reversa (RT), 0.4 µl de *primer forward*, 0.4 µl de *primer reverse*, 0.25 µl de la sonda *probe* (cada serotipo de forma separada) y 2 µl de ARN. Multiplicar los volúmenes por el número total de muestras.
- **Reacción de PCR**

- o Agregar 20 µl de máster mix en cada tubo.
- o Agregar 5 µl de muestra en cada tubo.
- o Agregar 5 µl de control interno en cada tubo.
- o Mezclar las muestras y los controles con un agitador por 15 segundos.
- o Centrifugar por 30 segundos a 3000 rpm.
- o Agregar 25 µl de la mezcla a cada pocillo.
- o Sellar la placa con un film adhesivo.

- **Programación del software**

- o Abrir el software del equipo (Bio rad CFX Manager)
- o En la barra de menús, seleccionar “File”, ingresar a “New” y luego “Protocol”.
- o En la ventana de protocolos programar los ciclos de la prueba (tabla 03).

Tabla 13: Programación de los ciclos en el equipo de q PCR

Proceso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	50°C	15 minutos
Desnaturalización	1	95°C	2 minutos
Amplificación	45	94°C	15 segundos
		55°C	40 segundos
		68°C	30 segundos

- o En la barra de herramientas, en la sección “Sample Volume” determinar el volumen de reacción en 25 µl.
- o Para seleccionar los fluoróforos en la barra herramientas seleccionar “Select Fluorophores”. Marcar las casillas de los fluoróforos utilizados:
 - “Channel 1” – **FAM** (DENV 1)

- “Channel 2” – **HEX** (DENV 2)
 - “Channel 3” – **Texas Red** (DENV 3)
 - “Channel 4” – **Cy5** (DENV 4)
 - o Velocidad de aumento de temperatura: seleccionar la opción “Default”
 - o En la barra de menús, seleccionar “File” y luego “Save” para guardar el protocolo creado.
- **Ejecución de qPCR**
 - o Abrir la tapa del termociclador (“Open Lid”) y colocar la placa sellada de PCR.
 - o La disposición de la placa de PCR debe quedar de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M1 D1	M3 D1	M5 D1	M7 D1	M9 D1	M11 D1	M13 D1	M15 D1	M17 D1	M19 D1	M21 D1	CN
B	M1 D2	M3 D2	M5 D2	M7 D2	M9 D2	M11 D2	M13 D2	M15 D2	M17 D2	M19 D2	M21 D2	CN
C	M1 D3	M3 D3	M5 D3	M7 D3	M9 D3	M11 D3	M13 D3	M15 D3	M17 D3	M19 D3	M21 D3	CP
D	M1 D4	M3 D4	M5 D4	M7 D4	M9 D4	M11 D4	M13 D4	M15 D4	M17 D4	M19 D4	M21 D4	CP
E	M2 D1	M4 D1	M6 D1	M8 D1	M10 D1	M12 D1	M14 D1	M16 D1	M18 D1	M20 D1	M2 D1	CA
F	M2 D2	M4 D2	M6 D2	M8 D2	M10 D2	M12 D2	M14 D2	M16 D2	M18 D2	M20 D2	M2 D2	CA
G	M2 D3	M4 D3	M6 D3	M8 D3	M10 D3	M12 D3	M14 D3	M16 D3	M18 D3	M20 D3	M2 D3	CE
H	M2 D4	M4 D4	M6 D4	M8 D4	M10 D4	M12 D4	M14 D4	M16 D4	M18 D4	M20 D4	M2 D4	CE

CP: Control positivo; CN: Control negativo; CA: Control de alicuotado; CE: Control de extracción

- o Cerrar la tapa (“Close Lid”)
- o Ejecutar el programa (“Start Run”)

f. Obtención e interpretación de resultados


- Los resultados fueron definidos por el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral (Ct).
- La validez de los resultados estuvo determinada por el resultado de los controles:

Tabla 14: Criterios de validación de los controles en la técnica RT-qPCR

Control	Resultado
Control de alicuotado	No debe mostrar la detección de fluorescencia para los fluoróforos de DENV.
Control de extracción	No debe mostrar la detección de fluorescencia para los fluoróforos de DENV.
Control positivo	Se debe observar la curva de detección de fluorescencia.
Control negativo	No debe mostrar la detección de fluorescencia para los fluoróforos de DENV, pero sí para la curva de control interno.
Control interno	En todas las muestras debe observarse la curva de detección de fluorescencia.

- Si la prueba no es validada por los controles, repetir la prueba.
- Si una de las repeticiones es positiva y la otra negativa, repetir la prueba.
- Cuando la muestra posee una alta carga viral, por competencia puede provocar que no se genere la curva del control interno.

Anexo 09: Ficha epidemiológica

 Ministerio de Salud <small>División Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Infecciosas</small>		Ficha de investigación clínico-epidemiológica para la vigilancia de dengue, chikungunya, zika, fiebre amarilla y otras arbovirosis													
<small>CIE 10: dengue sin signos (A97.0) dengue con signos de alarma(A97.1) dengue grave(A97.2) Chikungunya(A92.0) Chikungunya Grave(A92.5) Zika (U09.3), ver otras especificaciones de Zika en Directiva</small>															
I. SUBSISTEMA DE VIGILANCIA (elegir la vigilancia que corresponde)															
a. Definición de casos * (casos que cumplen criterio clínico y epidemiológico)		<input type="checkbox"/>													
b. Vigilancia centinela** (Solo para EESS centinela)		<input type="checkbox"/>													
c. Vigilancia de febriles*** (Toma de muestras frente al incremento de febriles en EESS)		<input type="checkbox"/>													
II. DATOS GENERALES:															
1. Fecha de Investigación:		<table border="1"> <tr> <td>Día</td> <td>Mes</td> <td>Año</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		Día	Mes	Año									
Día	Mes	Año													
2. GERES/ADRES/ADISA:		3. Red <input type="checkbox"/>													
5. Institución de salud:		4.EESS notificante <input type="checkbox"/>													
MINSA <input type="checkbox"/> EsSalud <input type="checkbox"/> Sanidad PNP <input type="checkbox"/> Sanidad FA <input type="checkbox"/> Privados <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/>															
III. DATOS DEL PACIENTE															
6. H.Clinica N° <input type="text"/>		7. Teléfono/Celular del paciente <input type="text"/>													
		8. Fecha de Nacimiento <input type="text"/>													
9. Apellido Paterno <input type="text"/>		Apellido Materno <input type="text"/>													
		Nombres <input type="text"/>													
10. DNI/Pasaporte <input type="text"/>		11. Edad (años) <input type="text"/>													
		12. Género <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F													
		13. Ocupación <input type="text"/>													
14. Departamento <input type="text"/>		15. Provincia <input type="text"/>													
		16. Distrito <input type="text"/>													
		17. Localidad (AF, Urb, Resid, Etc) <input type="text"/>													
		18 Dirección <input type="text"/>													
19. Gestante SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		20. Edad gestacional <input type="text"/> Semanas													
IV. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS (DATO DE IMPORTANCIA PARA ESTABLECER LUGAR DE INFECCIÓN)															
21. ¿Dónde estuvo en las últimas dos semanas (14 días) antes de enfermar?															
		Desde...../...../..... hasta...../...../.....													
		Desde...../...../..... hasta...../...../.....													
22. País <input type="text"/>		23. Departamento <input type="text"/>													
		24. Provincia <input type="text"/>													
		25. Distrito <input type="text"/>													
		26. Localidad <input type="text"/>													
		27. Dirección <input type="text"/>													
28. Caso autóctono SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		29. Caso Importado Nacional <input type="checkbox"/>													
		30. Caso Importado Internacional <input type="checkbox"/>													
31. Tuvo dengue anteriormente SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		32. Año <input type="text"/>													
33. Recibió vacuna anti amarilla SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		34. Año de vacunación <input type="text"/>													
35. Tiene comorbilidad SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		36. Cual <input type="text"/>													
V. DATOS CLÍNICOS															
37. Fecha de inicio de síntomas:		38. Fecha de toma primera muestra													
<table border="1"> <tr> <td>Día</td> <td>Mes</td> <td>Año</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		Día	Mes	Año				<table border="1"> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>							
Día	Mes	Año													
39. Fecha de toma segunda muestra		<table border="1"> <tr> <td>Día</td> <td>Mes</td> <td>Año</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		Día	Mes	Año									
Día	Mes	Año													
40. Signos y síntomas frecuentes															
Fiebre T + c <input type="checkbox"/> Artralgias <input type="checkbox"/> a. Manos <input type="checkbox"/> b. Pies <input type="checkbox"/> Migrañas <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/> Dolor ocular o retroocular <input type="checkbox"/> Dolor lumbar <input type="checkbox"/> Rash/exantema <input type="checkbox"/> Conjuntivitis no purulenta (que roja) <input type="checkbox"/> Náuseas/vómitos <input type="checkbox"/> Otros..... <input type="checkbox"/>		Signos de alarma Dolor abdominal intenso y continuo <input type="checkbox"/> Dolor torácico o disnea <input type="checkbox"/> Derrame seroso al examen clínico y/o por estudio de imágenes (ascitis o derrame pleural o pericárdico) <input type="checkbox"/> Vómitos persistentes <input type="checkbox"/> Disminución brusca de la Tª o hipotermia <input type="checkbox"/> Disminución de la diuresis (disminución del volumen urinario) <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Ictericia <input type="checkbox"/> Estado mental alterado (somnolencia, inquietud, irritabilidad o convulsión) <input type="checkbox"/> Incremento del hematocrito <input type="checkbox"/>													
		Signos de gravedad Pulso débil e indetectable <input type="checkbox"/> Extremidades frías o cianóticas <input type="checkbox"/> Diferencial de Presión Arterial \leq 20 mmHg. <input type="checkbox"/> Compromiso grave de órganos <input type="checkbox"/> Específicos: <input type="checkbox"/> Sangrado grave <input type="checkbox"/> Específicos: <input type="checkbox"/> Escala de Glasgow <input type="checkbox"/> Apertura ocular (1-4) <input type="checkbox"/> Respuesta motora (1-4) <input type="checkbox"/> Respuesta verbal (1-4) <input type="checkbox"/>													
VI. EXAMENES DE LABORATORIO															
LLENADO POR EL LABORATORIO REFERENCIAL															
a. ELISA NS1-Dengue <input type="checkbox"/> c. Aislamiento viral <input type="checkbox"/> b. qRT-PCR Suero <input type="checkbox"/> f. qRT-PCR Orina <input type="checkbox"/> d. ELISA IgM (1era muestra) <input type="checkbox"/> e. ELISA IgM (2da muestra) <input type="checkbox"/> g. Otros:..... <input type="checkbox"/> h. Muestra de tejido para inmunohistoquímica <input type="checkbox"/>		41. Prueba solifoliada <input type="checkbox"/> 42. Resultado Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> 44. Fecha de resultado <input type="text"/>													
VII. EVOLUCIÓN DE CASOS GRAVES Y EGRESO (SOLO PARA CASOS HOSPITALIZADOS)															
45. Hospitalizado SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		46. Fecha hospitalización <input type="text"/>													
47. Falleció SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		48. Fecha defunción <input type="text"/>													
49. Fue referido SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		50. Fecha referencia <input type="text"/>													
		51. Hospital# CS <input type="text"/>													
VIII. CLASIFICACIÓN															
52. Dengue sin signos de alarma Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>		57. Zika Sospechoso <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>													
53. Dengue con signos de alarma Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>															
54. Dengue grave Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>															
55. Chikungunya Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>															
56. Chikungunya grave Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>															
58. Otras arbovirosis Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>		59. Fiebre amarilla Síndrome febril Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>													
IX. OBSERVACIONES															
X. INVESTIGADOR Nombre de la persona responsable <input type="text"/> Cargo: <input type="text"/> Celular: <input type="text"/>															
		Firma y Sello <input type="text"/>													

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
001	CHANCHAMAYO	M	30/09/1991	29	18/09/2021	Positivo	Positivo dengue 1
002	CHANCHAMAYO	F	30/09/1990	30	18/09/2021	Negativo	Negativo
003	OXAPAMPA	M	15/08/1969	52	18/09/2021	Negativo	Negativo
004	CHANCHAMAYO	M	23/06/1994	27	16/09/2021	Positivo	Positivo dengue 1
005	SAN RAMON	F	17/05/1999	22	19/09/2021	Negativo	Negativo
006	CHANCHAMAYO	F	17/08/2006	15	18/09/2021	Positivo	Positivo dengue 2
007	SAN RAMON	M	3/08/1983	38	17/09/2021	Negativo	Negativo
008	VILLA MARIA DEL TRIUNFO	M	2/02/1980	41	19/09/2021	Positivo	Positivo dengue 2
009	CHANCHAMAYO	F	16/11/1966	54	19/09/2021	Negativo	Negativo
010	CHANCHAMAYO	M	6/01/1978	43	17/09/2021	Positivo	Positivo dengue 1
011	PERENE	M	31/03/1954	67	17/09/2021	Negativo	Negativo
012	PERENE	M	18/03/2003	18	17/09/2021	Positivo	Positivo dengue 1
013	CHANCHAMAYO	M	26/07/1998	23	17/09/2021	Negativo	Negativo
014	PERENE	F	8/11/2019	1	17/09/2021	Negativo	Negativo
015	CASTROVIRREYNA	F	21/04/2000	21	10/07/2021	Negativo	Negativo
016	PERENE	F	29/06/1987	34	12/07/2021	Negativo	Negativo
017	PACHACAMAC	M	2/02/1964	57	30/07/2021	Negativo	Negativo
018	PICHANAQUI	F	14/10/1997	23	7/08/2021	Negativo	Negativo
019	PERENE	F	21/09/1997	23	13/08/2021	Negativo	Negativo
020	ATE	M	1/04/1991	30	19/08/2021	Negativo	Negativo
021	PERENE	M	25/07/2006	15	18/08/2021	Positivo	Negativo
022	SANTA ANITA	M	6/08/1991	30	19/08/2021	Negativo	Negativo
023	PICHANAQUI	M	19/01/1990	31	10/08/2021	Negativo	Negativo
024	PICHANAQUI	M	17/01/2021	0	9/08/2021	Negativo	Negativo
025	PICHANAQUI	M	29/04/2010	11	3/07/2021	Negativo	Negativo
026	PERENE	M	14/06/1988	32	7/02/2021	Negativo	Negativo
027	RIO NEGRO	F	23/07/2003	17	5/02/2021	Positivo	Positivo dengue 2
028	PICHANAQUI	M	21/04/1965	55	5/02/2021	Negativo	Negativo
029	CONCHUCOS	F	25/07/2007	13	3/02/2021	Positivo	Positivo dengue 1
030	CIENEGUILLA	M	31/07/1961	59	12/11/2020	Positivo	Positivo dengue 2
031	CHILCA	F	15/08/1982	37	2/07/2020	Negativo	Negativo
032	EL MANTARO	M	7/01/1995	25	1/07/2020	Negativo	Negativo
033	PICHANAQUI	M	18/02/1997	23	17/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
034	PICHANAQUI	F	22/11/1996	23	14/02/2020	Negativo	Negativo
035	PICHANAQUI	M	2/07/1972	47	15/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
036	RIO NEGRO	M	18/01/1991	29	17/02/2020	Positivo	Negativo
037	PERENE	F	21/05/2005	14	14/02/2020	Negativo	Negativo
038	PERENE	M	24/07/1994	25	10/02/2020	Negativo	Negativo

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
039	PICHANAQUI	F	7/09/1965	54	12/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
040	PICHANAQUI	F	6/11/2002	17	13/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
041	HUANCAYO	F	25/05/1998	21	12/02/2020	Negativo	Negativo
042	RIO TAMBO	F	12/01/2002	18	6/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
043	PERENE	F	23/05/2003	16	13/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
044	PICHANAQUI	M	1/06/1980	39	4/02/2020	Negativo	Negativo
045	PICHANAQUI	F	26/01/2006	14	12/02/2020	Negativo	Negativo
046	SAN JUAN DE LURIGANCHO	M	1/02/1978	42	7/02/2020	Negativo	Negativo
047	PICHANAQUI	M	14/07/1988	31	6/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
048	PERENE	F	5/02/2010	10	12/02/2020	Negativo	Negativo
049	PICHANAQUI	F	3/04/1984	35	8/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
050	PICHANAQUI	F	28/06/1987	32	10/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
051	PICHANAQUI	F	2/10/1999	20	5/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
052	PICHANAQUI	F	21/01/1996	24	6/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
053	PICHANAQUI	F	5/06/1957	62	12/02/2020	Negativo	Negativo
054	EL TAMBO	F	5/07/1977	42	7/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
055	RIO NEGRO	M	6/02/1989	30	25/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
056	PICHANAQUI	M	17/11/2012	7	28/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
057	INDEPENDENCIA	M	2/10/1965	54	3/02/2020	Positivo	Positivo dengue 2
058	PICHANAQUI	F	21/11/1961	58	24/01/2020	Positivo	Negativo
059	PICHANAQUI	F	4/06/2006	13	3/02/2020	Negativo	Negativo
060	PERENE	F	24/09/1972	47	27/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
061	PICHANAQUI	M	23/05/2002	17	30/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
062	SATIPO	M	4/12/1978	41	28/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
063	PICHANAQUI	F	12/05/1988	31	28/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
064	PICHANAQUI	F	14/04/1991	28	23/01/2020	Negativo	Negativo
065	PERENE	F	27/12/1961	58	21/01/2020	Negativo	Negativo
066	PICHANAQUI	F	17/07/1962	57	17/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
067	PICHANAQUI	M	18/04/1997	22	18/01/2020	Negativo	Negativo
068	PERENE	M	20/07/1996	23	20/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
069	VILLA MARIA DEL TRIUNFO	F	13/07/1989	30	9/01/2020	Positivo	Negativo
070	PICHANAQUI	F	19/02/1982	37	11/01/2020	Positivo	Negativo
071	PERENE	F	30/09/1989	30	10/01/2020	Negativo	Positivo dengue 2
072	PICHANAQUI	M	12/08/1995	24	13/01/2020	Positivo	Negativo
073	PICHANAQUI	M	6/11/1998	21	8/01/2020	Positivo	Negativo
074	PERENE	F	15/09/1973	46	8/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
075	SINCOS	M	22/07/1983	36	11/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
076	PICHANAQUI	F	14/08/2005	14	9/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
077	PICHANAQUI	F	21/11/1979	40	10/01/2020	Negativo	Negativo
078	PICHANAQUI	M	2/06/2006	13	11/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
079	POMACOCHA	F	16/12/2002	17	6/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
080	PICHANAQUI	M	1/12/2005	14	4/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
081	PERENE	M	3/06/1990	29	6/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
082	SAN SEBASTIAN	M	18/07/1991	28	3/01/2020	Positivo	Positivo dengue 2
083	CHANCHAMAYO	F	6/08/1997	22	16/10/2019	Positivo	Negativo
084	PICHANAQUI	F	2/06/1995	24	15/10/2019	Negativo	Negativo
085	PICHANAQUI	M	24/09/1999	20	16/10/2019	Negativo	Negativo
086	PICHANAQUI	F	20/08/1949	70	16/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
087	PACHACAMAC	F	10/04/1996	23	17/10/2019	Negativo	Negativo
088	NUEVO CHIMBOTE	F	6/11/1990	29	19/12/2019	Negativo	Negativo
089	MAZAMARI	M	4/01/1985	34	19/12/2019	Negativo	Negativo
090	SATIPO	M	12/07/2004	15	17/12/2019	Negativo	Negativo
091	PICHANAQUI	M	6/05/1977	42	23/12/2019	Negativo	Negativo
092	FERREÑAFE	M	18/04/1991	28	19/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
093	PERENE	M	6/05/1982	37	16/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
094	PICHANAQUI	M	2/03/1996	23	12/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
095	PICHANAQUI	M	24/07/2012	7	10/12/2019	Negativo	Negativo
096	PICHANAQUI	M	14/08/1997	22	12/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
097	PICHANAQUI	M	4/12/1972	47	13/12/2019	Negativo	Negativo
098	PICHANAQUI	M	27/01/1999	20	16/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
099	PERENE	F	17/11/1983	36	5/12/2019	Negativo	Positivo dengue 2
100	RIO NEGRO	F	22/11/1975	44	9/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
101	RIO NEGRO	F	18/05/1988	31	6/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
102	PICHANAQUI	M	24/03/1972	47	5/12/2019	Positivo	Positivo dengue 2
103	PERENE	M	25/10/1998	21	3/12/2019	Negativo	Negativo
104	PICHANAQUI	M	15/10/1980	39	5/12/2019	Positivo	Negativo
105	PICHANAQUI	M	17/01/2008	11	4/12/2019	Negativo	Negativo
106	PICHANAQUI	F	14/02/1997	22	7/12/2019	Negativo	Negativo
107	PICHANAQUI	F	29/11/2007	12	7/12/2019	Negativo	Negativo
108	PICHANAQUI	F	2/01/1999	20	3/12/2019	Negativo	Negativo
109	PICHANAQUI	M	29/08/2011	8	4/12/2019	Negativo	Negativo
110	PICHANAQUI	M	20/04/2001	18	6/11/2019	Negativo	Negativo
111	PICHANAQUI	M	26/09/1985	34	26/10/2019	Positivo	Negativo
112	PERENE	F	6/11/2014	5	5/11/2019	Negativo	Negativo
113	PERENE	M	22/06/1967	52	28/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
114	RIO NEGRO	F	30/01/1987	32	4/11/2019	Negativo	Negativo

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
115	PERENE	M	2/06/1999	20	28/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
116	PERENE	M	2/10/1997	22	30/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
117	ATE	M	6/06/1995	24	30/11/2019	Positivo	Negativo
118	PAUCARPATA	M	5/08/1995	24	11/11/2019	Negativo	Negativo
119	PERENE	F	16/01/2005	14	23/10/2019	Negativo	Negativo
120	PERENE	M	9/02/1970	49	26/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
121	PICHANAQUI	F	19/12/1988	30	27/11/2019	Negativo	Negativo
122	PICHANAQUI	F	5/03/1936	83	8/11/2019	Negativo	Negativo
123	PICHANAQUI	M	2/09/1996	23	2/12/2019	Positivo	Negativo
124	PICHANAQUI	M	9/12/1998	20	9/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
125	PICHANAQUI	M	5/03/2004	15	30/11/2019	Negativo	Negativo
126	PICHANAQUI	F	30/05/1968	51	29/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
127	PICHANAQUI	F	15/02/1978	41	2/12/2019	Negativo	Negativo
128	AMARILIS	F	28/08/1998	21	28/11/2019	Negativo	Negativo
129	PICHANAQUI	F	23/03/2016	3	24/10/2019	Negativo	Negativo
130	PICHANAQUI	F	5/11/2000	19	11/11/2019	Negativo	Negativo
131	PICHANAQUI	M	18/04/2013	6	28/11/2019	Negativo	Negativo
132	PICHANAQUI	M	24/12/1984	34	11/11/2019	Negativo	Positivo dengue 2
133	PERENE	M	19/07/1990	29	28/10/2019	Negativo	Positivo dengue 2
134	PICHANAQUI	F	14/08/1995	24	11/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
135	MARCAS	M	15/10/2003	16	8/11/2019	Negativo	Negativo
136	PICHANAQUI	M	20/09/2006	13	28/11/2019	Negativo	Negativo
137	PICHANAQUI	F	11/02/1995	24	24/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
138	PICHANAQUI	F	26/10/1990	29	9/11/2019	Negativo	Positivo dengue 2
139	EL TAMBO	M	5/05/1981	38	22/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
140	CHANCHAMAYO	F	28/09/2000	19	28/10/2019	Negativo	Negativo
141	PERENE	M	20/11/1971	48	9/11/2019	Negativo	Negativo
142	PICHANAQUI	M	3/12/2000	18	18/11/2019	Negativo	Negativo
143	RIO NEGRO	M	8/12/2006	12	30/10/2019	Negativo	Negativo
144	SAN JUAN DE LURIGANCHO	M	10/01/1992	27	21/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
145	PICHANAQUI	F	13/06/2005	14	30/10/2019	Negativo	Positivo dengue 2
146	PERENE	F	12/09/2000	19	30/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
147	PERENE	M	1/01/1986	33	12/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
148	PICHANAQUI	F	20/01/1990	29	29/10/2019	Positivo	Negativo
149	PICHANAQUI	F	18/07/1992	27	1/11/2019	Positivo	Negativo
150	PICHANAQUI	M	6/04/2005	14	29/10/2019	Negativo	Negativo
151	PICHANAQUI	F	25/12/2007	11	28/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
152	PICHANAQUI	F	21/10/1982	37	25/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
153	CHANCHAMAYO	F	14/12/2004	14	21/11/2019	Negativo	Negativo
154	PICHANAQUI	F	27/09/2002	17	25/11/2019	Negativo	Negativo
155	PICHANAQUI	F	29/05/1991	28	23/11/2019	Negativo	Negativo
156	RIO TAMBO	M	28/04/1964	55	19/11/2019	Negativo	Negativo
157	PICHANAQUI	M	2/10/1998	21	21/11/2019	Negativo	Negativo
158	PICHANAQUI	M	14/08/1952	67	16/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
159	RIO NEGRO	F	17/03/1995	24	12/11/2019	Positivo	Negativo
160	PICHANAQUI	F	8/04/1988	31	12/11/2019	Positivo	Positivo dengue 2
161	PICHANAQUI	M	24/07/1978	41	13/11/2019	Negativo	Negativo
162	SATIPO	F	14/07/1981	38	12/11/2019	Negativo	Negativo
163	RIO NEGRO	M	10/10/1982	37	21/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
164	SANTIAGO DE SURCO	F	2/03/1987	32	9/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
165	PICHANAQUI	F	14/02/2007	12	10/10/2019	Negativo	Positivo dengue 2
166	PICHANAQUI	M	7/05/1967	52	14/10/2019	Positivo	Negativo
167	PICHANAQUI	M	3/09/2006	13	5/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
168	PICHANAQUI	F	23/04/1965	54	7/10/2019	Negativo	Positivo dengue 2
169	PERENE	F	16/01/2005	14	1/10/2019	Negativo	Negativo
170	TARMA	F	24/01/1986	33	1/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
171	RIO NEGRO	M	4/01/1961	58	1/10/2019	Negativo	Negativo
172	LURIN	M	4/12/1977	41	2/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
173	PICHANAQUI	F	10/03/2005	14	2/10/2019	Negativo	Positivo dengue 2
174	RIO NEGRO	F	1/05/1958	61	1/10/2019	Positivo	Positivo dengue 2
175	EL TAMBO	F	11/02/1984	35	17/09/2019	Positivo	Positivo dengue 2
176	MOCHE	F	22/08/1975	44	19/09/2019	Positivo	Positivo dengue 2
177	PICHANAQUI	F	28/04/2004	15	26/09/2019	Positivo	Positivo dengue 2
178	RIO NEGRO	F	12/07/1993	26	25/09/2019	Positivo	Positivo dengue 2
179	PICHANAQUI	F	10/07/2016	3	27/09/2019	Positivo	Positivo dengue 2
180	PICHANAQUI	M	28/02/2003	16	11/09/2019	Negativo	Positivo dengue 2
181	CHANCHAMAYO	F	4/07/1984	35	24/07/2019	Negativo	Negativo
182	PICHANAQUI	F	31/10/1978	40	26/08/2019	Positivo	Positivo dengue 2
183	CHAGLLA	F	4/08/1988	31	15/08/2019	Positivo	Positivo dengue 2
184	EL AGUSTINO	F	14/09/1970	48	15/08/2019	Positivo	Positivo dengue 2
185	PERENE	F	11/06/1953	66	15/08/2019	Positivo	Positivo dengue 2
186	PICHANAQUI	F	14/07/2012	7	15/07/2019	Negativo	Negativo
187	PICHANAQUI	M	13/09/1982	36	19/07/2019	Negativo	Negativo
188	PICHANAQUI	F	24/11/2003	15	10/05/2019	Negativo	Negativo
189	PICHANAQUI	M	24/11/1968	50	24/07/2019	Positivo	Positivo dengue 2
190	PERENE	M	2/03/1995	24	23/07/2019	Positivo	Positivo dengue 2

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
191	PERENE	M	24/10/2012	6	4/07/2019	Negativo	Negativo
192	PICHANAQUI	F	8/09/1990	28	4/07/2019	Negativo	Negativo
193	LA UNION	M	27/08/1989	29	10/06/2019	Positivo	Positivo dengue 2
194	PERENE	M	5/04/1994	25	4/06/2019	Negativo	Negativo
195	PICHANAQUI	M	17/06/1999	19	6/06/2019	Positivo	Positivo dengue 2
196	TOCACHE	M	22/12/1972	46	26/06/2019	Negativo	Negativo
197	PERENE	F	12/09/1985	33	27/06/2019	Positivo	Positivo dengue 2
198	PICHANAQUI	F	17/11/1991	27	8/07/2019	Positivo	Positivo dengue 2
199	EL TAMBO	F	13/05/1993	26	24/06/2019	Negativo	Negativo
200	PICHANAQUI	F	25/01/2003	16	19/06/2019	Positivo	Negativo
201	PICHANAQUI	M	8/07/2000	18	21/06/2019	Positivo	Positivo dengue 2
202	HUANCAYO	F	27/05/1982	37	12/06/2019	Positivo	Positivo dengue 2
203	SANTA ANITA	M	28/08/1977	41	27/05/2019	Negativo	Negativo
204	CHANCHAMAYO	M	8/03/1969	50	27/05/2019	Negativo	Negativo
205	PICHANAQUI	M	11/12/2006	12	3/06/2019	Negativo	Negativo
206	PICHANAQUI	F	22/07/2000	18	27/05/2019	Negativo	Negativo
207	PICHANAQUI	M	2/04/2000	19	3/06/2019	Negativo	Negativo
208	PICHANAQUI	M	5/01/1996	23	27/05/2019	Negativo	Negativo
209	PICHANAQUI	M	29/02/1964	55	29/05/2019	Negativo	Negativo
210	PICHANAQUI	M	23/03/1964	55	28/05/2019	Negativo	Negativo
211	PERENE	F	25/12/1983	35	30/05/2019	Negativo	Negativo
212	PICHANAQUI	F	20/11/1998	20	15/05/2019	Positivo	Positivo dengue 2
213	PERENE	M	22/12/1969	49	20/05/2019	Negativo	Negativo
214	PERENE	M	16/05/1974	45	22/05/2019	Negativo	Negativo
215	PICHANAQUI	M	16/04/1957	62	23/05/2019	Negativo	Negativo
216	SAN RAFAEL	M	9/06/1997	21	22/05/2019	Negativo	Negativo
217	PICHANAQUI	F	31/05/1977	42	23/05/2019	Negativo	Negativo
218	PICHANAQUI	F	10/07/1980	38	22/05/2019	Negativo	Negativo
219	SAN JUAN BAUTISTA	M	23/08/1999	19	18/05/2019	Negativo	Negativo
220	PICHANAQUI	M	28/07/1971	47	23/04/2019	Positivo	Negativo
221	PICHANAQUI	M	27/06/2008	10	3/05/2019	Positivo	Positivo dengue 2
222	PICHANAQUI	F	18/01/1989	30	29/04/2019	Positivo	Positivo dengue 2
223	LURIGANCHO	M	19/08/1999	19	27/04/2019	Negativo	Negativo
224	RIO TAMBO	M	27/02/1972	47	3/05/2019	Negativo	Negativo
225	PICHANAQUI	M	20/11/1954	64	24/04/2019	Negativo	Negativo
226	LA UNION	F	23/01/2008	11	24/04/2019	Positivo	Positivo dengue 2
227	PICHANAQUI	F	5/02/2010	9	14/04/2019	Negativo	Negativo
228	PERENE	M	10/05/2005	13	14/04/2019	Negativo	Negativo

Anexo 10: Resultados de las técnicas RT-qPCR y ELISA NS1 (continuación)

ID	Distrito de residencia	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad	Fecha de toma de muestra	ELISA NS1	RT-qPCR
229	CHILCA	F	28/06/1980	38	10/04/2019	Negativo	Negativo
230	PERENE	F	8/07/1996	22	11/04/2019	Negativo	Negativo
231	PICHANAQUI	M	8/07/2012	6	12/04/2019	Negativo	Negativo
232	COCHAS	M	12/12/1955	63	9/04/2019	Negativo	Negativo
233	PICHANAQUI	F	24/07/1992	26	25/03/2019	Negativo	Positivo dengue 2
234	PERENE	F	19/06/2000	18	1/04/2019	Negativo	Positivo dengue 2
235	CHANCHAMAYO	M	28/04/1994	24	26/03/2019	Negativo	Negativo
236	PICHANAQUI	M	8/09/1989	29	26/03/2019	Positivo	Positivo dengue 2
237	SAN RAMON	F	4/11/2001	17	28/03/2019	Negativo	Negativo
238	HUANCAYO	M	11/04/1991	27	22/03/2019	Negativo	Negativo
239	PICHANAQUI	M	4/08/1990	28	25/03/2019	Negativo	Negativo
240	CHACLACAYO	F	8/10/1980	38	19/03/2019	Negativo	Negativo
241	PERENE	M	9/02/1992	27	13/03/2019	Negativo	Negativo
242	PICHANAQUI	F	13/03/1981	38	18/03/2019	Positivo	Positivo dengue 2
243	AHUAYCHA	M	18/04/2005	13	11/03/2019	Negativo	Negativo
244	PICHANAQUI	F	12/08/1984	34	10/02/2019	Negativo	Negativo
245	YAUYOS	F	28/02/1991	27	19/02/2019	Negativo	Negativo

Sombreado naranja: Falsos positivos

Sombreado verde: Falsos negativos

Anexo 11: Programación del test de diagnósticos binarios en el programa R Statistics

A continuación, se describe la secuencia de comandos utilizados para el análisis mediante el Test de diagnósticos binarios en el programa R statistics © versión 4.1.1, donde se utilizó la función modificada utilizada por Delgado L, 2015.

```
eetdb <- function (s1, s0, r1, r0, conf = 0.95)
{
  if (conf >= 1 | conf <= 0)
  {
    stop("El nivel de confianza debe estar entre 0 y 1. Introduce un nuevo
valor \n")
  }
  if (s1 < 0 | s0 < 0 | r1 < 0 | r0 < 0)
  {
    stop("Las frecuencias observadas no pueden ser valores negativos.
Introduce nuevos valores \n")
  }
  if (abs(s1 - trunc (s1)) > 0 | abs(s0 - trunc (s0)) > 0 | abs(r1 - trunc (r1)) > 0
| abs(r0 - trunc (r0)) > 0)
  {
    stop("Las frecuencias observadas tienen que ser valores enteros
positivos. Introduce nuevos valores \n")
  }
  if (s0 == 0 && r1 == 0)
```

```

{
stop("Las frecuencias s0 y r1 no pueden ser 0. Introduce nuevos valores
\n")
}
z = qnorm (1 - (1-conf) / 2, 0, 1)
n <- s1 + s0 + r1 + r0
ss <- s1 + s0
rr <- r1 + r0

```

#Estimación de los parámetros

```

Se <- s1 / ss
Sp <- r0 / rr
Y <- Se + Sp - 1
if (Y <= 0)
{
stop("La estimación del índice de Youden tiene que ser mayor que 0.
Introduce nuevos valores \n")
}
p <- ss / n

```

#Intervalo score modificado para la sensibilidad

```

LSe <- 0.5 + ((ss + z^4 / 53) * (Se - 0.5)) / (ss + z^2) - (z / (ss + z^2)) * sqrt(ss
* Se * (1 - Se) + z^2 / 4)
USE <- 0.5 + ((ss + z^4 / 53) * (Se - 0.5)) / (ss + z^2) + (z / (ss + z^2)) *
sqrt(ss * Se * (1 - Se) + z^2 / 4)

```

#Intervalo score modificado para la especificidad

```
LSp <- 0.5 + ((rr + z^4 / 53) * (Sp - 0.5)) / (rr + z^2) - (z / (rr + z^2)) *
```

```
sqrt(rr * Sp * (1 - Sp) + z^2 / 4)
```

```
USp <- 0.5 + ((rr + z^4 / 53) * (Sp - 0.5)) / (rr + z^2) + (z / (rr + z^2)) *
```

```
sqrt(rr * Sp * (1 - Sp) + z^2 / 4)
```

#Resultados

```
cat("\n")
```

```
cat(" SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD \n")
```

```
cat("\n")
```

```
cat("La estimación de la sensibilidad es ", 100 * Se, "% y su error estándar
```

```
es ", sqrt(VarSe), "\n")
```

```
cat("\n")
```

```
cat("El intervalo de confianza score modificado al ", 100 * conf, "% de
```

```
confianza para la sensibilidad es: (" , LSe, " ; " , USE, ") \n")
```

```
cat("\n")
```

```
cat("La estimación de la especificidad es ", 100 * Sp, "% y su error estándar
```

```
es ", sqrt(VarSp), "\n")
```

```
cat("\n")
```

```
cat("El intervalo de confianza score modificado al ", 100 * conf, "% de
```

```
confianza para la especificidad es: (" , LSp, " ; " , USp, ") \n")
```

```
cat("\n")
```

```
}
```

Anexo 12: Preparación de soluciones utilizadas para la limpieza y desinfección de superficies

- **Alcohol 70° (1000 ml)**

$$V [\text{alcohol } 70^\circ] = \frac{70 \times 1000\text{ml}}{96}$$

$$V [\text{alcohol } 70^\circ] = 729 \text{ ml}$$

$$V [\text{agua}] = 71 \text{ ml}$$

- **Hipoclorito de sodio 1% (1000 ml)**

Para lograr una concentración de hipoclorito al 1% agregar 4 partes de agua y una parte de hipoclorito de sodio al 5% (lejía comercial).

$$V [\text{agua}] = 800 \text{ ml}$$

$$V [\text{hipoclorito de sodio al } 5\%.] = 200 \text{ ml}$$