**DETERMINACIÓN DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE
CIRCULANTES EN SINCELEJO MEDIANTE LA TÉCNICA RT-PCR**

**YALEYVIS AMPARO BUELVAS MONTES
ANA MARIA ESCAMILLA PADILLA
Estudiantes Trabajo de Grado**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2004**

**DETERMINACIÓN DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE
CIRCULANTES EN SINCELEJO MEDIANTE LA TÉCNICA RT-PCR**

**YALEYVIS AMPARO BUELVAS MONTES
ANA MARIA ESCAMILLA PADILLA
Estudiantes Trabajo de Grado**

**Trabajo como requisito para optar al título como Biólogo con Énfasis en
Biotecnología**

**Director
PEDRO JOSE BLANCO T
Mcs Medicina Tropical**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2004**

**Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este
trabajo.**

Artículo 12 resolución 02-03

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEORICO	16
1.1 ENFERMEDAD DEL DENGUE	16
1.1.1 Síntomas	16
1.1.2 Inmunología	17
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	18
1.2.1 Taxonomía	18
1.2.2 Morfología	19
1.2.3 El vector	21
1.2.4 Cadena de transmisión del dengue	23
1.3 RT – PCR	25
1.4 ANTECEDENTES	27
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVOS GENERALES	32
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
3. METODOLOGÍA	33
3.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO	33

3.2 Prueba estadística	34
3.3 PRUEBA DE LABORATORIO	34
3.3.1 Extracción ARN	34
3.3.2 RT – PCR	35
3.3.2.1 RT-PCR de Controles positivos	35
3.3.2.2 RT – PCR de las muestras	36
3.4 ELECTROFORESIS	38
4. RESULTADOS	39
4.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO	39
4.2 PRUEBAS DE LABORATORIO	43
4.2.1 Extracción de ARN	43
4.2.2 RT – PCR	45
4.2.2.1 RT-PCR de controles positivos	45
4.2.2.2 RT – PCR de las muestras	46
5. DISCUSIÓN	49
6. CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS	58
ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Cepas utilizadas como controles positivos	36
Tabla 2. Ubicación en el genoma de los cebadores usados para amplificar el ADN del virus del dengue	38
Tabla 3. Manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes sospechosos de padecer dengue en el municipio de Sincelejo - 2003	41
Tabla 4. Barrios afectados por infección por virus del dengue en el municipio de Sincelejo – 2003	42

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Estructura del virus del dengue	20
Figura 2. <i>Aedes aegypti</i> , mosquito transmisor del virus del dengue	21
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 4. Transmisión del virus del dengue por <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 5. Ubicación de los barrios de Sincelejo mas afectados con dengue en el año 2003	43

LISTA DE GRAFICAS

	pag
Gráfica 1. Variación del número de casos de dengue desde 1999 hasta 2003 en Sincelejo	14
Gráfica 2. Distribución del dengue según la edad en la población estudiada en Sincelejo en el año 2003	40
Gráfica 3. Distribución del dengue según el sexo en la población estudiada en Sincelejo en el año 2003	40
Gráfica 4. Distribución de los serotipos del virus del dengue circulantes en Sincelejo en el año 2003	47

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Pág.
Fotografía 1. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio de dos protocolos de extracción de ARN de dos muestras positivas para dengue confirmadas por ELISA	44
Fotografía 2. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio de la estandarización de la concentración ideal de cebadores amplificando el control positivo Den – 3	45
Fotografía 3. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio de los productos amplificados por RT-PCR de los controles positivos de los 4 serotipos del virus del dengue	46
Fotografía 4. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio que muestra la amplificación del serotipo DEN-2	47
Fotografía 5. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio que muestra la amplificación del serotipo DEN-3	48
Fotografía 6. Electroforesis de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio que muestra la amplificación del serotipo DEN-4	48

LISTA DE ANEXOS

	pag
Anexo A. Formato de consentimiento informado	64
Anexo B. Criterios de Inclusión para Dengue según la Organización Mundial para la salud (OMS)	65
Anexo C. Ficha Epidemiológica para Dengue	66

INTRODUCCION

El dengue es una de las enfermedades más importantes de los humanos causadas por virus del grupo Arbovirus. El virus del dengue es un miembro de la familia *Flaviviridae* del cual se conocen cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4.

El dengue se presenta en dos formas: fiebre de dengue (FD) y fiebre hemorrágica de dengue (FDH); esta última, es causada por una segunda infección con un virus de dengue diferente al que causó la primera, ocurriendo así, una respuesta inmune incompleta contra el segundo serotipo. La FDH se ha convertido en un grave problema de salud pública debido a la severidad del cuadro clínico y al aumento en la distribución de la enfermedad tanto en número como en distribución geográfica (DASSSALUD,2003).

El dengue es una enfermedad endémica en el municipio de Sincelejo debido a que esta ciudad presenta las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad; es decir, presenta un clima tropical con varias estaciones de lluvia y por ser un área urbana presenta factores de riesgo como son el almacenamiento abierto de aguas, canales de irrigación y alta prevalencia de lugares que permiten

el estancamiento de aguas lluvias y la perpetuación de los criaderos del mosquito vector.

En Sincelejo, se presentan las dos formas del dengue y se desconoce cuales son los serotipos circulantes en la población; por lo cual, el tratamiento y las medidas de control que se aplican, en muchas ocasiones no se realizan con la efectividad y eficiencia requeridas.

Entre los años 2000 y 2003, se registró un aumento de 162 casos de dengue clásico y 2 casos de dengue hemorrágico en el Departamento de Sucre; en el municipio de Sincelejo se reportó un aumento de 96 casos de dengue clásico y 2 casos de dengue hemorrágico (DASSSALUD, 2003). Frente a este hecho se han realizado campañas de prevención y control por parte de las entidades de salud pública que han controlado los casos; sin embargo, la enfermedad prevalece (Gráfica 1).

De acuerdo a los datos suministrados por DASSSALUD en el departamento de Sucre la mayoría de los casos de dengue clásico y hemorrágico se presentan en el área urbana de Sincelejo por lo que se convierte en uno de los principales problemas de salud pública de esta ciudad.

Debido a la presencia de esta infección vírica y al desconocimiento sobre los serotipos existentes, fue necesario investigar acerca de los serotipos del virus del dengue que circulan en el municipio de Sincelejo y causan esta enfermedad;

también, se estudió el comportamiento de la enfermedad del dengue, que es de gran importancia para conocer su epidemiología.

Además, la identificación de los serotipos circulantes en Sincelejo permitió hacer un diagnóstico confirmatorio real debido a que la prueba molecular que se aplicó se basa en detección y amplificación específica del genoma del tipo de virus circulante.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ENFERMEDAD DEL DENGUE

La enfermedad del dengue es causada por un *flavivirus* y transmitida por un mosquito vector, *Aedes*. Esta es endémica en muchas áreas tropicales del mundo incluyendo América Central y Sur América, el Caribe y el Suroeste de Asia (Cuzzobbo, 1996).

Es una enfermedad viral aguda, infecciosa, caracterizada por fiebre, mialgias severas y una erupción cutánea. Esta enfermedad se presenta en dos formas: fiebre de dengue y fiebre hemorrágica de dengue. La fiebre del dengue (FD), es una enfermedad de tipo gripal que afecta a los niños mayores y a los adultos, pero rara vez causa la muerte. La fiebre hemorrágica de dengue (FDH), es la forma más grave, en la que pueden sobrevenir hemorragias y a veces un estado de choque, que lleva a la muerte. (Vélez, 2003).

1.1.1 SÍNTOMAS

Los síntomas de la fiebre del dengue varían según la edad y el estado general de salud del paciente. Los lactantes y los niños pequeños pueden presentar un cuadro de fiebre y erupción, difícil de distinguir de la gripe, el sarampión, el

paludismo, la hepatitis infecciosa y otras enfermedades febriles. Los síntomas que caracterizan a la enfermedad del dengue son fiebre que dura de 3 a 5 días (rara vez mas de 7 días y suele ser bifásica), cefalea intensa, mialgias, artralgias, dolor retroorbital, anorexia, alteraciones del aparato gastrointestinal y erupción. En algunos casos aparecen tempranamente eritemas generalizados. Para cuando comienza la defervescencia, suele aparecer una erupción maculopapular generalizada. En cualquier momento durante la fase febril pueden aparecer fenómenos hemorrágicos de poca intensidad, petequias epistaxis o gingivorragia. (Organización Panamericana de la Salud, 2003)

1.1.2 INMUNOLOGÍA

Mediante la picadura del mosquito infectado, el virus del dengue es inyectado directamente en el torrente sanguíneo por el cual circula hasta alcanzar su tejido blanco, el sistema fagocítico mononuclear, constituido por monocitos circulantes y macrófagos tisulares. El virus penetra y se replica en el citoplasma de estas células generando una segunda viremia detectable en los primeros 4 días del periodo febril.

Coincidiendo con la desaparición de la viremia aparecen los primeros anticuerpos neutralizantes; la respuesta inmune humoral es distinta según se trate del primer contacto con el virus del dengue (infección primaria) o de una infección en una persona inmune a otro serotipo del virus (infección secundaria). En la primera los anticuerpos son predominantemente tipo IgM y los títulos totales se elevan

moderadamente. En la infección secundaria predomina la IgG sobre la IgM y los títulos de anticuerpos totales son muy altos (Vélez, 2003).

Las manifestaciones hemorrágicas y el síndrome de choque son subsecuentes a una segunda infección con un virus de dengue diferente al que causó la primera, ocurriendo una respuesta inmune incompleta contra el segundo serotipo. Los virus entran al organismo y si encuentran anticuerpos preexistentes forman inmunocomplejos que les permiten penetrar más fácilmente a la célula diana (el fagocito nuclear), dentro del cuál hay una masiva replicación viral. Este fagocito activado produce factores de aumento de permeabilidad vascular, principalmente eicosanoides, TNF e interleucinas. El factor vascular es probablemente de naturaleza inmunológica y es uno de los factores más determinantes del choque del dengue (González *etal*, 1993).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

1.2.1 TAXONOMÍA

La fiebre del dengue clásico, del dengue hemorrágico y el síndrome de choque son entidades clínicas provocadas por los serotipos del virus del dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) (Rodríguez *etal*, 2001).

El virus del dengue está clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

Grupo: Arbovirus

Familia: *Flaviviridae*

Género: *Flavivirus*

Especie: Dengue

Al género *flavivirus* pertenecen además un gran número de especies entre las que figuran: el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la fiebre amarilla (Buchen-Osmond, 2003).

1.2.2 MORFOLOGÍA

El virus del dengue tiene un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro, contienen un genoma no segmentado y consiste de una sola molécula lineal positiva de ARN con un peso molecular alrededor de 3.3×10^6 con polaridad de mensajero por lo que es infeccioso inmediatamente después que es inoculado al humano y a invadido a la célula hospedera.

El ARN del virus del dengue ha sido completamente secuenciado, tiene una longitud de 10.703 nucleótidos, el extremo 5' del genoma tiene una caperuza con un nucleótido metilado y el extremo 3' no presenta la cola de poli A (Buchen-Osmond, 2003).

El genoma del virus está compuesto por 3 genes que codifican para proteínas estructurales, nucleocapside o proteína del núcleo (C), proteína asociada a membrana (M), y la proteína de la envoltura (E) y 7 genes que codifican para 7 proteínas no estructurales (NS). Los dominios responsables para la neutralización, fusión e interacción con los receptores del virus están asociados con la proteína de la envoltura. El orden de las proteínas codificadas es: 5'- C-PrM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5- 3' (Dengue, 2001).

El ácido nucleico está rodeado por una cápside de isometría icosaédrica constituida por la proteína C que está unida por medio de la matriz a la membrana externa; esta envoltura contiene proyecciones glicoproteicas que corresponden a la proteína E (Figura 1), que posee sitios antigénicos que desencadenan la producción de anticuerpos neutralizantes los cuales son responsables de las reacciones cruzadas con otros *t flavivirus* y anticuerpos potenciadores responsables de la invasión viral a la célula huésped (Ocazonez, 1993).

1.2.3 EL VECTOR

Existen aproximadamente 29 especies del género *Aedes*, siendo el *Aedes albopictus* y el *Aedes aegypti*, las principales especies involucradas en la transmisión natural del dengue. El *A. Albopictus* es una especie antropofílica y rara vez se encuentra en bosques naturales (Vazeille *etal*, 2001).

El *Aedes aegypti* es un pequeño insecto blanquinegro con rayas en el dorso y en las patas (Figura 2).

El *Ae. aegypti*, como todos los mosquitos, tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: Fase acuática con tres formas evolutivas diferentes: (Huevo, larva y pupa) y fase aérea o de adulto (Figura 3).

La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce dependiendo de la temperatura. Los huevecillos soportan la desecación hasta de un año, por eso es muy frecuente encontrar grandes cantidades de larvas en las temporadas de lluvias, en diversos recipientes. El período de larvas comprende cuatro grados evolutivos denominados primeros, segundo, tercero y cuarto. El tiempo aproximado para pasar de un grado a otro, es de aproximadamente 48 horas. El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge (del agua) el mosquito que corresponde a la fase aérea. Una vez que los mosquitos han emergido, se alimenta por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores.

La supervivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Generalmente, el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse, una vez copulada e inseminada la hembra,

el esperma que lleva es suficiente para fecundar todos los huevecillos que produce durante su existencia, no aceptando otra inseminación adicional.

El horario de actividad de picadura de los mosquitos es en horas de baja intensidad de la luz solar; en general, se inicia al amanecer (6:00 a 8:00 hrs.) o antes del anochecer (17:00 a 19:00 hrs.). Las curvas de actividad alimenticia muestran que hay dos períodos de mayor actividad, más durante el alba que por las noches. Sin embargo, la alimentación puede estar condicionada a la posibilidad de obtener sangre de los habitantes de las casas, pudiendo modificar su actividad y picar aun en horas de la noche y en el día.

El período de vida del mosquito adulto se ve afectado por las características climáticas, principalmente la temperatura, pues condicionan sus actividades de alimentación, reproducción y reposo. A una temperatura inferior a 4°C o superior a los 40°C generalmente no sobreviven (Secretaría de Salud, 2002).

1.3.1 CADENA DE TRANSMISIÓN DEL DENGUE

Para iniciar el ciclo de transmisión, el humano necesita desarrollar una viremia que permita la infección del zancudo, lo cual sucede cuando el zancudo, *Aedes aegypti*, pica a un enfermo de 6 a 8 horas antes de la fiebre y durante la etapa febril. Después de la ingestión del virus, los títulos de este en el zancudo

disminuyen en la fase llamada “eclipse” o de incubación extrínseca que dura de 1 a 4 días. Esta fase es seguida por la rápida replicación del virus.

El virus dentro del zancudo hembra infectado necesita pasar el “umbral de infección” y la barrera mesenteronal; para esto se da la diseminación del virus a través de la hemolinfa, facilitando la infección y la multiplicación del virus en las glándulas salivales. Una vez infectado, el zancudo será capaz de transmitir la infección, entonces pica a un ser humano sano y cierra la cadena de transmisión al desarrollar este una alta viremia (Luna *et al*, 1993) (Figura 4).

1.4 RT-PCR

El genoma de muchos virus de importancia clínica está compuesto de ARN, los más sobresalientes, en esta clase, son el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el Virus de la Hepatitis C (HCV), la familia de Enterovirus (EV) y Arbovirus.

Dado que el ARN usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de ARN, una copia es ADN complementario (ADNc) que es empleado para la metodología de PCR (Roche, 2003).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica "in vitro" que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN, es una tecnología patentada que genera múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos de un

organismo y provee un mecanismo para detectar cantidades diminutas de organismos con alta especificidad. En el campo del diagnóstico clínico, los laboratoristas pueden tomar una muestra mínima de material genético, copiar la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo (Roche, 2003).

Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del cebador a la secuencia de RNA objetivo.
2. Transcripción reversa: La polimerasa RT cataliza la extensión del cebador mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del ADNc complementario al ARN.
4. PCR.

La PCR es un proceso que consta de tres pasos que forman un ciclo, el que se repite un número determinado de veces.

Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos:

1. Denaturalización
2. Unión (alineación)

3.Extensión

Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos (usualmente 30-40 ciclos).

1.5 ANTECEDENTES

Los primeros relatos históricos sobre el dengue mencionan la isla de Java en 1779 y Filadelfia (E.U.A.) en 1780, como los primeros lugares donde se reconocieron brotes de la enfermedad (Chiparelli *etal*, 1996).

En Filipinas, en el 1954 se describió por primera vez, la fiebre hemorrágica de dengue o dengue hemorrágico que desde entonces se ha constituido en una amenaza cada vez mayor para la humanidad (González *etal*, 1993).

En el siglo XX la primera epidemia de dengue clásico en América, comprobada por laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela en 1963-1964 asociándose al serotipo DEN-3. El serotipo DEN-4 fue introducido en 1981 y desde entonces los tipos 1,2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países donde *Aedes aegypti* está presente. En el Caribe co-circulan actualmente varios serotipos de dengue, incluyendo el DEN-3, introducido desde 1994 a partir de Nicaragua, el cual constituye un riesgo importante para la

población americana, que es extensamente susceptible a esta variante (Chiparelli *et al*, 1996).

En Colombia durante la década de 1950 se logró controlar la población del *Aedes aegypti*, en 1968 se presenta la reinfestación por este vector afectando la Costa Atlántica, Pacífica, los Santanderes y los valles de los ríos Magdalena y Cauca (Luna *et al*, 1993).

Desde 1970, después de la reinfestación con *Aedes aegyptis*, en Colombia han ocurrido varias epidemias de dengue con circulación de los 4 serotipos. En Colombia, en 1971 se aisló el virus dengue 2 y ha circulado desde entonces con el dengue 1. El dengue 3 circuló por un período corto a mitad de los años 70 y no se ha vuelto a presentar en nuestro territorio. En 1984 comienza a circular el dengue 4 (De la Hoz, 1993).

A partir de 1991 – 1992, se inicia en Colombia la ocurrencia de casos de dengue hemorrágico. Para 1990 la tasa por 100000 habitantes era de 0.11, la cual asciende en 1998 a 12.4 por 100.000 habitantes y en 1999 desciende nuevamente a 2.6 casos por 100000. En 1999, los departamentos que reportaron un mayor número de casos fueron: Santander, Quindío, Cundinamarca, Norte de Santander y Caquetá (Ministerio de Salud, 2001).

El Sistema Nacional de Salud confirmó 139 casos de dengue clásico y hemorrágico durante los años 1991 y 1992. En el área metropolitana de

Bucaramanga se detectó el primer caso en enero de 1992, comenzando un brote que se convirtió en la epidemia más numerosa y amenazadora que se ha presentado de dengue hemorrágico en Colombia hasta ahora y es la tercera en importancia por el número de casos en toda América (González *et al*, 1993).

En el departamento de Sucre, no se encuentra información oficial sobre la aparición de los primeros casos de la enfermedad. Los datos estadísticos sobre el número de casos se referencian a partir del año 1995 (Gráfica 1).

En estas epidemias se realizaron estudios donde se emplearon fundamentalmente los ensayos inmunoenzimáticos (Artimos De Oliveira *et al*, 1998), por ejemplo: para el diagnóstico de la infección de virus de dengue en trabajadores se utilizó un ensayo serológico de un ELISA comercial que es un procedimiento más fácil y menos costoso que la inhibición de la hemoaglutinación y la detección del virus por RT-PCR. El ELISA es un ensayo estándar no cuantitativo diseñado para el diagnóstico de infección primaria y secundaria del virus dengue por evaluación de anticuerpos de IgG e IgM, pero la reactividad cruzada entre varios flavivirus crea un problema potencial para tal diagnóstico reportando resultados falsos positivos (Cuzzobbo *et al*, 1996).

Sin embargo, datos obtenidos de otras publicaciones muestran que cuando el ELISA indirecto es evaluado en comparación con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en 100 sueros durante un brote en Australia, la sensibilidad y

especificidad fue de 99.2% y 96.2% respectivamente (Cuzzobbo *et al*,1996). El ELISA de captura de IgM reporta tener una especificidad de 94% para la infección primaria a los 5 días de la enfermedad (Vaughn *et al*, 1999).

Del mismo modo Artimos De Oliveira (1998) demostró en un estudio de diagnóstico de infección de dengue por detección de anticuerpos de IgM que la infección puede ser detectada en muestras de saliva de pacientes, y que la sensibilidad de la prueba de ELISA fue del 80% en muestras de saliva recolectadas a los 5 días después de iniciada la enfermedad y una sensibilidad del 90% en muestras recolectadas a los 10 días después. La especificidad de la prueba fue del 100%.

Estos resultados demuestran que para un diagnóstico satisfactorio utilizando la prueba de ELISA se debe hacer con dos muestras pareadas: una muestra en la fase aguda (0-5 días) después del inicio de los síntomas y una segunda muestra en la fase convaleciente (8 días) después del inicio de los síntomas, las cuales permitan establecer un aumento en los títulos entre las dos muestras (Rodríguez, 2003).

Aunque estos métodos son confiables y permiten obtener resultados reproducibles, el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica de amplificación de ADN *in vitro*, ha sido aplicada rápidamente al diagnóstico de las infecciones por el virus del dengue; estas técnicas de PCR

poseen diversas ventajas sobre las técnicas inmunológicas convencionales (Domínguez *et al*, 1997), como detectar cantidades diminutas del virus con alta especificidad.

Usando la RT-PCR se pudo determinar el virus del dengue en muestras de suero diluido con un nivel de sensibilidad similar al de un ensayo de foco fluorescente cuantitativo de virus de dengue en cultivo de células (Sudiro *et al*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar que serotipos del virus del dengue causan la enfermedad en Sincelejo mediante técnicas moleculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar que serotipo(s) del virus del dengue circulan en el área urbana de Sincelejo.
- Estudiar el comportamiento epidemiológico de la enfermedad del dengue en Sincelejo.

3. METODOLOGÍA

3.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO

En este estudio se incluyeron todas aquellas personas, que ingresaron al Hospital Regional de II Nivel de Sincelejo, en el período comprendido entre marzo del 2003 y febrero del 2004, con síntomas de padecer infección por dengue y de caso autóctono. A estos pacientes se les solicitó su consentimiento informado según lo consignado en el decreto 008430 que rige desde 1999 emitido por el Ministerio de Salud (Anexo A) y posteriormente se les diligenció la ficha epidemiológica de investigación de casos como lo recomienda el Ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Salud (Anexo B).

Las muestras de sangre (5 mL), utilizadas en este estudio, fueron tomadas de 18 pacientes, con 3 días o más de iniciados los síntomas y que se reportaron como caso probable, caso confirmado, caso compatible o caso sospechoso de dengue clásico o hemorrágico según los criterios de inclusión definidos por el Ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Salud (Ministerio de Salud e Instituto Nacional de salud, 2001) (Anexo C).

Además, utilizando los resultados reportados por el ELISA de captura realizado por DASSSALUD con el estuche “UMELISA IgM plus” se seleccionaron 29 sueros que también se incluyeron en el estudio.

3.2 PRUEBA ESTADÍSTICA

Se realizó un estudio descriptivo-retrospectivo de las fichas epidemiológicas de los pacientes; para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Epi-info 2002 y para el análisis estadístico se usaron tablas de frecuencias relativas en las que se involucraron todos los casos incluidos en el estudio.

3.3 PRUEBAS DE LABORATORIO

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN

La obtención del ARN viral para todos los sueros se realizó utilizando el procedimiento recomendado por el fabricante del reactivo TRIZOL (INVITROGEN), específico para extracción de ARN, cuyos componentes principales son el isotiocianato de guanidina y el fenol.

Se evaluaron dos protocolos de extracción de ARN (protocolo 1 y protocolo 2) que siguen pasos similares. Para ambos protocolos se tomaron 5 ml de sangre total sin anticoagulante y se separó el suero por centrifugación a 2500 rpm por 15

minutos. En el protocolo 1, la lisis celular y el aislamiento viral se hacen en un solo paso adicionando conjuntamente a 300 μ l de suero, 300 μ l de trizol y 240 μ l de cloroformo alcohol isoamílico, seguido de una centrifugación a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, obteniéndose una fase acuosa; a diferencia del protocolo 2 donde se hizo la lisis celular y el aislamiento viral agregando 300 μ l de suero y 300 μ l de trizol y centrifugando a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante que contenía el ARN se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 60 μ l de cloroformo, se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó hasta obtener la fase acuosa que contenía el ARN. Esta fase acuosa obtenida en ambos protocolos se le adicionó isopropanol para precipitar el ARN viral. En el protocolo 1, se le agregó un volumen igual de isopropanol y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos; mientras que en el protocolo 2, se precipitó con 150 μ l de isopropanol y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 5°C. El precipitado obtenido en cada protocolo fue lavado con 300 μ l de etanol al 75 %, secado a temperatura ambiente y resuspendido en 15 μ l de agua libre de RNasa tratada con dietilpirocarbonato al 0.1 %.

3.3.2 RT - PCR

3.3.2.1 Controles positivos

Los controles positivos para los cuatros serotipos del virus del dengue utilizados en la estandarización de la RT-PCR (Tabla 1), fueron donados por la doctora María del Pilar Bernal, Virologa del Instituto Nacional de Salud.

3.3.2.2 RT-PCR de las muestras

A 20 μ l de buffer de PCR se le adicionaron 5 μ l de ARN extraído de cada muestra, este buffer contenía la siguiente mezcla: 7.5 μ l agua tratada con DEPC, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris, Triton X-100 al 0.1%, los 4 deoxinucleotidos trifosfato a una concentración de 200 μ M, cloruro de magnesio 1.5 mM, Taq DNA polimerasa (INVITROGEN) a una concentración de 0.025 U / μ l de reacción, 0.025 U/ μ l de reacción de transcriptasa inversa AMV (INVITROGEN).

Para la amplificación de las muestras se probaron dos concentraciones diferentes de cebadores, 0.5 μ M y 0.25 μ M.

Para cada muestra incluida en el estudio, se prepararon 4 reacciones donde cada reacción contenía el cebador universal (D1) y un cebador específico para cada serotipo: dengue 1 (TS1), dengue 2 (TS2), dengue 3 (TS3) y dengue 4 (DEN 4).

La transcripción reversa fue llevada a cabo a 42 °C por 60 minutos seguido por 60 ciclos de amplificación de 90 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 72 °C por 5 minutos.

La secuencia de los 5 cebadores que se emplearon en la metodología fue la utilizada por Harris y colaboradores en 1998 :

D1: 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G

TS1: 5'- CGT CTC AGT GAT CCG GGG G

TS2: 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG

TS3: 5'- TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C

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

Estos cebadores se alinean en el genoma del virus como lo muestra la tabla 2.

3.4 ELECTROFORESIS

Al final de la amplificación 12 µl del producto amplificado, fueron mezclados con 3 µl de Orange G, y examinados por corrido electroforético en gel de agarosa al 1.5% a 90 Voltios utilizando un buffer de corrido Tris Borato Edta (TBE) 1X. La tinción de los geles de corrido se realizó con una solución de Bromuro de Etidio 5µg/mL. Para observar las bandas de los productos amplificados se utilizó el transiluminador de luz ultravioleta UV Transilluminator UVP modelo TM-10E.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO

En este estudio fueron revisadas 47 fichas epidemiológicas de pacientes ingresados en el Hospital Regional de II Nivel de Sincelejo y con posible diagnóstico de dengue, estas fichas fueron analizadas y clasificadas según la edad, sexo, manifestaciones clínicas y localidad.

Usando las variables de números de casos y edad (Gráfica 2), se demostró que el grupo más afectado por infección del virus del dengue resultó ser el rango de edad comprendido entre 1 y 10 años, seguidos por el grupo de pacientes menores a 30 años.

Estudiando las variables de número de casos y el sexo, se encontró que el 60.5% de los pacientes incluidos en el estudio corresponde al sexo femenino y el 35.5 % al masculino (Gráfica 3).

Entre las principales manifestaciones clínicas (Tabla 3) figuraron: fiebre, cefalea, dolor abdominal, mialgias, entre otras.

Estas manifestaciones clínicas son las más comunes en casos de dengue clásico. Como se pudo observar, no se presentó un porcentaje alto de signos hemorrágicos.

En toda el área urbana del municipio de Sincelejo, se presenta la enfermedad del virus del dengue; sin embargo, existen barrios en los cuales el número de casos es mayor, como lo muestra la tabla 4, donde los barrios Ciudadela Universitaria, La Selva y El Cortijo presentaron un mayor porcentaje; 17.2%, 16% y 15.9%, respectivamente para un total de 49.1% entre estos barrios (Figura 5).

4.2 PRUEBAS DE LABORATORIO

4.2.1 EXTRACCION DE RNA

El trizol resultó ser un reactivo eficiente para la extracción de RNA..

De los dos métodos evaluados, el protocolo uno no mostró buenos resultados para la extracción de RNA de dos muestras positivas para dengue, esto se evidenció en el momento de realizar el corrido de las muestras positivas amplificadas por RT-PCR; los corridos electroforéticos mostraron que con el protocolo dos se observaron los fragmentos esperados (Fotografía 1).

4.2.2 RT – PCR

4.2.2.1 RT-PCR de controles positivos

Para una óptima amplificación de los controles positivos se probaron dos concentraciones de cebadores, 0.5 μ M y 0.25 μ M. La concentración de los cebadores a 0.5 μ M no mostró ningún fragmento; utilizando los cebadores a la concentración de 0.25 μ M se obtuvo un fragmento claro para el control positivo Den-3 (Fotografía 2).

Otro parámetro que se evaluó fue la concentración de los controles positivos; la dilución 1:2 fue la concentración a la cual se pudieron amplificar estos controles (Fotografía 3).

4.2.2.2 RT- PCR DE LAS MUESTRAS

Para realizar el procedimiento de detección y tipificación del virus del dengue, se empleó el método de extracción viral desarrollado con el reactivo Trizol y se combinó con la RT-PCR.

Al procesar las muestras por RT-PCR, se encontraron 26 casos de dengue, 24 fueron de dengue clásico, 2 de dengue hemorrágico y el resto negativas para dengue. En la serotipificación por RT-PCR los resultados mostraron que el serotipo de mayor circulación en el área urbana de Sincelejo fue el serotipo 2 (Fotografía 4) con 17 casos, luego el serotipo 3 (Fotografía 5) con 7 casos, y el menos circulante el serotipo 4 (Fotografía 6) con 4 casos. Los dos casos de dengue hemorrágico fueron causados por los serotipos 2 y 3 (Gráfica 4).

DISCUSIÓN

La fiebre del dengue, y su forma severa la fiebre hemorrágica del dengue resultan de la infección por uno o más de los 4 serotipos del virus del dengue. La fiebre del dengue ha prevalecido en los últimos años, se estima que 80 millones de personas que viven en las regiones tropicales son afectadas anualmente (Domínguez *etal*, 1997).

En esta investigación se realizó la identificación y la tipificación del virus a partir de muestras clínicas utilizando la RT-PCR.

El RNA utilizado para el procedimiento de RT-PCR, fue extraído de 47 muestras de suero, utilizando 2 protocolos de extracción. De los dos métodos para extraer ARN viral, probados en este estudio, el protocolo dos permitió obtener ARN de la muestra utilizada. Esto pudo ser debido a que en este protocolo se dió una mejor desnaturalización de proteínas y aislamiento del ARN al dejar actuar individualmente al TRIZOL, cuyo componente principal es el Isotiocianato de Guanidina y el Fenol que son específicos para la desnaturalización de proteínas y el aislamiento del ARN; a diferencia del protocolo uno donde se adicionó con el Cloroformo, actuando los tres reactivos conjuntamente. Además, el protocolo dos presentó mayores tiempos de incubación obteniéndose un mejor precipitado del ARN con Isopropanol.

El protocolo dos utilizado en este estudio, desarrollado siguiendo las instrucciones del fabricante del estuche para extracción de ARN-INVITROGEN, fue eficiente para la extracción del ARN del virus del dengue y además es un método cuyo costo es menor en comparación con otros métodos de extracción, como el descrito por Lanciotti y otros (1992), cuyos reactivos (Isitiocianato de Guanidina, Fenol, Mercaptoetanol y Sarkosyl) en forma individual generan un mayor costo y mayor manipulación.

Para la aplicación y la optimización de la técnica RT-PCR se deben tener en cuenta ciertos parámetros, tales como la concentración de cebadores y las temperaturas de extensión y alineamiento que son fundamentales para la obtención de resultados óptimos (Löffert *et al*, 1999). Por tal motivo fue variada la concentración de los cebadores y los mejores resultados se obtuvieron a una concentración de 0.25 μM , que es la mitad de la concentración usada inicialmente, 0.5 μM . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Raengsakulrach *et al* (2002) donde la disminución a la mitad de la concentración de los cebadores usados en la RT-PCR de especímenes clínicos con dengue, redujo las bandas no específicas en el gel.

De las 47 muestras procesadas por RT-PCR, para detección y tipificación del virus del dengue, realizado en el laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sucre, se encontraron 26 casos positivos para dengue, de los cuales 24 fueron de dengue clásico y 2 de dengue hemorrágico. En este caso los resultados

negativos se deben, posiblemente, a que las muestras no fueron procesadas inmediatamente sino que se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento; siendo -70°C la temperatura óptima para la conservación de un virus de ARN, motivo que pudo conllevar a la degradación del ARN impidiendo la identificación del virus por la RT-PCR.

La RT-PCR mostró como serotipos circulantes causantes de la enfermedad del dengue en el área urbana de Sincelejo, a los serotipos DEN-2, DEN-3 y DEN-4; lo cual se confirmó con el hallazgo de fragmentos amplificados que corresponden, en su tamaño, a los reportados por Harris *et al* (1998) quienes encontraron fragmentos de 482 pb para DEN-1, 119 pb para DEN-2, 290 pb para DEN-3 y 389 para DEN-4.

Los resultados mostraron además, que el serotipo de mayor circulación fue el serotipo 2 y el menos circulante el serotipo 4. Estos resultados concuerdan con los reportados por el Ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Salud 2001, donde reportan la circulación de los 4 serotipos del virus del dengue en el país. En Colombia en 1971 se aisló el virus del dengue 2 y ha circulado desde entonces con el dengue 1. El dengue 3 circuló por un periodo corto a mitad de los años 70 y en el 2001 se ha vuelto a presentar en el municipio de Floridablanca, departamento de Santander. Y respecto a la circulación del dengue 4, este comienza a circular en el año 1984.

Los registros del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle mostraron, en el 1987, la circulación simultánea del dengue 1 y el dengue 2, en el 1990 y en el 1991 dengue 1 y dengue 4, y en el 1992 dengue 1, 2 y 4 (Rosso *et al*, 1994).

En este estudio se relacionó la patogenicidad de los serotipos que causan dengue en Sincelejo, teniendo en cuenta la cantidad de síntomas que presentaban los afectados, y también el recuento de plaquetas en los primeros 2 días de hospitalización. Basado en estos parámetros encontramos que el serotipo 2 causa un mayor número de síntomas que el serotipo 3; el reporte de recuento de plaquetas no mostró grandes diferencias ya que todos los pacientes presentaron plaquetopenia menor a $200.000/\text{mm}^3$. Sin embargo, no se puede asegurar que la sintomatología sea más severa cuando es causada por el serotipo 2; para poder afirmar esto se necesitaría conocer la evolución del paciente desde el inicio de la enfermedad.

Además de este estudio molecular, se realizó un estudio seroepidemiológico con los 47 pacientes incluidos en la presente investigación mostrando que el grupo más afectado por infección con dengue fue el rango de edad entre 1 y 10 años. Estos resultados son similares a los descritos por Arguelles *et al* (1997), en la evaluación nutricional de niños afectados por dengue, encontrando que el grupo de mayor afección fue el rango de edad entre 2 y 15 años. De igual manera, en Asia tropical se observó dengue hemorrágico y síndrome de choque de dengue en

niños menores de 15 años de edad; las tasas de letalidad y hospitalización fueron la tercera parte en niños (Organización Panamericana de la Salud, 2002).

El análisis de los resultados encontrados en la incidencia de la enfermedad sobre el sexo reveló una afección mayor en el sexo femenino (60.5 %) a diferencia del masculino. En un estudio realizado por la Organización Panamericana de la Salud (1998), se reportó una alta afección en las niñas. A diferencia de los resultados encontrados por Orozco *et al* (1998), donde la enfermedad prevaleció en el sexo masculino con un porcentaje de 71.4 %, sobre el femenino con 28.6 %; lo que sugiere que la infección por dengue no tiene predilección de sexo.

Entre las manifestaciones clínicas más comunes estuvieron fiebre, cefalea y dolor abdominal; el bajo porcentaje observado de signos hemorrágicos se debe a que no hubo un gran número de casos de fiebre de dengue hemorrágico reportados en el municipio de Sincelejo a lo largo del año 2003 (DASSSALUD, Departamento de Epidemiología , 2003). Este descenso tanto del dengue hemorrágico como del clásico se debió posiblemente al ajuste en la definición de casos realizado por el Ministerio de protección Social en Salud y aplicado a este municipio; sin embargo, el poco compromiso comunitario para combatir el dengue ha afectado de alguna forma a todos los municipios del departamento (DASSSALUD, 2003).

Los barrios Ciudadela Universitaria (17.2 %), la Selva (16 %) y el Cortijo (15.9 %) fueron los mas afectados por la enfermedad del dengue, esto puede ser debido a que estas zonas presentan ciertas condiciones como son almacenaje abierto de

aguas y estancamientos de aguas lluvias que permiten la perpetuación de los criaderos del mosquito vector (Secretaria de Salud, 2002). Además, por ser Sincelejo una ciudad en progreso presenta cambios demográficos como la urbanización incontrolada y el continuo crecimiento de la población originando un almacenaje inadecuado de las aguas, y mal manejo del sistema de aguas residuales que incrementan la densidad de la población del *Aedes aegypti* y facilita la transmisión de la enfermedad del dengue (Secretaria de Salud, 2002).

6. CONCLUSIONES

Con la RT-PCR se confirmó la presencia del virus en pacientes sospechosos con dengue y además, permitió determinar en forma satisfactoria los serotipos del virus que causaron la enfermedad.

Los serotipos causantes de la infección por virus del dengue en el casco urbano del municipio de Sincelejo en el año 2003 fueron los serotipos DEN- 2, serotipo DEN- 3 y el serotipo DEN- 4

El serotipo de mayor circulación fue el serotipo DEN- 2 con un porcentaje de 34 %, seguido por el serotipo DEN-3 con un porcentaje de 15 % y el serotipo DEN- 4 con 12.6 %.

Con el método del trizol, se logro obtener ARN viral en muestras de pacientes que tenían mas de 8 días de iniciados los síntomas.

La concentración más adecuada en la utilización de los cebadores para la amplificación fue 0.25 micromolar.

El análisis de las fichas epidemiológicas demostró que los barrios más afectados fueron La Ciudadela Universitaria, La Selva y El Cortijo; por presentarse en ellos el mayor número de casos.

Se demostró que la población mas afectada por esta enfermedad, en el año 2003, fueron los niños menores de 10 años.

Los síntomas mas frecuentes en los pacientes con dengue fueron: Fiebre con 99.6%,cefalea con 76.1%, dolor abdominal con 54.5%, siendo los síntomas hemorrágicos los de menor frecuencia.

RECOMENDACIONES

Emplear la técnica RT-PCR sería útil con mayor regularidad en estudios de diagnóstico donde la identificación del virus del dengue sea difícil de hacer debido a bajos títulos vírales en suero.

Se recomienda hacer un seguimiento al paciente con enfermedad del dengue desde el primer día de hospitalización, para poder establecer la relación misma, entre la gravedad de la enfermedad y el serotipo causante de la misma.

Determinar los serotipos y subtipos que causen la enfermedad del dengue en todo el departamento de Sucre.

Realizar más a menudo proyectos de este tipo, donde identifiquen el agente causante de la enfermedad, para que las campañas de control difundidas a las demás entidades prestadoras de salud combatan en forma directa y efectiva la enfermedad.

REFERENCIAS

- ARGUELLES LM, *etal.* Evaluación nutricional de niños y adolescentes con diagnóstico de dengue. En: Bol of Sanit Panam. Vol. 103 (1997); p. 245-251. Citado por: OROZCO, Néida *etal.* Incidencia de dengue en niños y adolescentes. Policlínico Docente “ José Martí ” Santiago de Cuba, 2001
- ARTIMOS DE OLIVEIRA, Solange *etal.* Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. En: Journal of Virological Methods. Vol. 77 (may.-oct. 1998); p. 81-86
- BUCHEN-OSMOND, C. 00.026.0.01.013. Dengue virus. [on line]. 2003 Versión 3. USA Web: www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTV/dB/.
- . 00.026.0.01. *Flavivirus*. [on line]. 2003 Versión 3. USA Web: www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTV/dB/.
- CUZZOBBO A. *Etal.* Commercial assays for the serological diagnosis of dengue infections. En: Arbovirus Research in Australia, papers from the Seventh Arbovirus Research in Australia Symposium and the Second Mosquito Control Association of Australia Conference. Vol 7 (nov. 1996); p. 25-29. Citado por: SCHWARTZ, E *etal.* Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. Journal of Virological Methods, 2001

CHIPARELLI, Hector y SCHELOTTO, Felipe. Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. Universidad de Montevideo. 1996

Dengue[online].2001

Web: http://bvs.insp.mx/componen/bibliodengue/bibliografias/who/Capitulo_1.pdf

DASSSALUD (Departamento Administrativo de Seguridad Social en Salud de Sucre). Sincelejo. 2003

DASSSALUD. Departamento de Epidemiología. Sincelejo. 2003

DOMÍNGUEZ, Delfina *et al.* Identificación de los serotipos del virus del dengue mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En: Revista Cubana de Medicina Tropical: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Vol. 48, No. 3 (sep.-dic. 1997); , p. 155–160

DE LA HOZ, Fernando. Epidemiología del Dengue Hemorrágico en Colombia. Memorias curso – Taller del Dengue y Fiebre Amarilla. Bucaramanga 1993.p. 53-54

GONZÁLEZ Gerardo y MENDEZ B. Ángela. Dengue Hemorrágico en niños: extractó del trabajo de investigación durante la epidemia de 1992 en Bucaramanga. Memorias curso - taller nacional del dengue y fiebre amarilla. Centro de investigaciones en Enfermedades Tropicales. 1993, p. 7 – 11

HARRIS, Eva *etal.* Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by single – tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. En: Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36, No 9 (1998); p. 2634 – 2639

LANCIOTTI, R *etal.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase - polymerase chain reaction. Journal Clinical of Microbiology. Vol. 30 (1992); p. 545-551

LOFFERT, Dirk *etal.* Optimization of Multiplex PCR. En: QUIAGEN, Vol: 2 (1999)

LUNA, Jorge y BUENO Adriana. El Vector del Dengue. Memorias Curso taller Nacional de Dengue y Fiebre Amarilla. Bucaramanga. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. 1993.p. 23 – 41.

MINISTERIO DE SALUD – DIRECCION GENERAL DE SALUD. Bogotá - Colombia. Dengue. 2001

MINISTERIO DE SALUD E INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Comportamiento por regiones del dengue. [on line] Bogotá - Colombia. SIVIGILA. 2001 Web: www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLEO2-02.htm

MINISTERIO DE SALUD E INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Propuesta de Funcionamiento Nacional de laboratorios de dengue. Bogotá - Colombia. 2001

OCAZIONEZ, Raquel. Etiología y Diagnostico de la Fiebre Hemorrágica del Dengue. Memorias curso-taller nacional de dengue y fiebre amarilla. Bucaramanga. Centro de investigaciones en Enfermedades tropicales. 1993.p. 12-17

OROZCO, Néida *et al.* Incidencia de dengue en niños y adolescentes. [on line] Santiago de Cuba, 1998 web: www.bus.sid.cu/revistas/mtr/vol53_1_01/htm

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. El dengue y el dengue hemorrágico. Panorama histórico en las Américas EN: Revista panamericana de salud publica. Vol 5, (2003).

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el control de las enfermedades transmisibles.[on line] Washington 2002 Web: WWW. Cepis.org.p/eswww/saludvivi/dengue.htm

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Plan continental e intensificación del combate a *Aedes aegypti*. EN: Revista panamericana de salud publica. Vol 3 No 2, (1998); p 124-130

RAENGSAKULRACH, Boonyos *et al.* Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for detection of dengue virus in clinical specimens. En: Journal of Virological Methods. Vol.105 (mar.-may.2002); p.219-232

ROCHE. Tecnología Amplicor PCR.[on line] ROCHE 2003 Web:www.
roche.cl/diagnostics/tecnologia.htm

RODRÍGUEZ, Maria *etal*. Situación del dengue en las Américas período 2001-
2002. Ministerio de Salud Pública Instituto "Pedro Kouri", 2003. P. 2-4

RODRÍGUEZ, Orestes *etal*. Caracterización de Pacientes con Diagnóstico
Presuntivo de Dengue en el Brote Epidémico del año 1997.En: Revista Cubana
Médica, Vol. 53(2001).

ROSSO, Fernando *etal*. Dengue Hemorrágico en el Hospital Universitario del Valle
[on line] Colombia Médica. Bogotá 1994
Web: [www. calombiamedica.univalle.edu.co.vol25No1/dengue.htm](http://www.calombiamedica.univalle.edu.co/vol25No1/dengue.htm)

SECRETARIA DE SALUD. Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia
Epidemiológica, Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por
vectores[online] CENAVE. México.2002
Web:www.cenave.gov.mx/dengue/default.asp?id=10

SUDIRO, Mirawati *etal*. Microplate-reverse hybridization method to determine
dengue virus serotype. En: Journal of Virological Methods. Vol. 73 (sept.-
feb.1998); p. 229-235

VAUGHN, D *etal.* Rapid Serologic Diagnosis of Dengue Virus Infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary. En: Journal of Virology 1999

VAZEILLE, Marie *etal.* Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. En: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 65 (2001); p.491-497

VÉLEZ, Hernán *etal.* Fundamentos de Medicina, Enfermedades Infecciosas. Corporación para Investigaciones Biológicas. 6 ed. Bogotá. 2003, p. 787 – 788

ANEXOS

ANEXO A.. Formato de Consentimiento Informado

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN BIOTECNOLOGIA
LABORATORIO DE CIENCIAS BIOMEDICAS

DETERMINACION DE LOS SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE EN SINCELEJO UTILIZANDO LAS TECNICAS RT-PCR Y ELISA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ he sido informado(a) por los estudiantes de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre, Yaleyvis Buelvas y Ana María Escamilla, sobre el trabajo que realizan en Dengue en el municipio de Sincelejo, utilizando para ello técnicas de biología molecular, motivo por el cual me tomaran una muestra de sangre periférica con el fin de diagnosticarme IgM contra dengue y PCR para detectar presencia de ARN de Dengue.

Este trabajo también maneja todas las garantías que me ofrecen, admito que estoy de acuerdo a participar en este trabajo de investigación.

Firma y cédula del paciente aprobando su consentimiento

ANEXO B. Criterios de Inclusión para Dengue según la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Dengue Clásico: manifestaciones, fiebre alta, cefalea, malestar general, dolor retroocular, mialgias, artralgias, erupción máculo-papular, que pueden confundirse fácilmente con otros exantemas vírales. El periodo de incubación va desde 3 a 14 días, siendo generalmente 4 a 7 días. Las hemorragias cutáneas son frecuentes (prueba del torniquete positivo, petequias o ambas) siendo importante diferenciar las formas hemorrágicas inusuales (hemorragia gastrointestinal) en un cuadro de Dengue clásicos, del Dengue hemorrágico.

Dengue hemorrágico: además de la fiebre o antecedente reciente de fiebre se debe verificar: 1) por lo menos una de las siguientes manifestaciones hemorrágicas: a) prueba del torniquete positiva, b) petequias, c) equimosis o púrpura d) hemorragia de las mucosas, tracto gastrointestinal, lugares de punción y otros 2) trombocitopenia menor de 100,000 mm³. 3) extravasación de plasma que se evidencia por cifras de hematocrito mayores al 20% del basal, descenso del hematocrito mayor del 20% después del tratamiento y derrame pleural, ascitis o hipoproteinemia. Si a todo esto se agregan además signos de colapso circulatorio: pulso rápido y débil, presión diferencial disminuida a 20 mmHg o menos, hipotensión ortostática, piel fría y húmeda y alteración del sensorio, estaremos frente a un Síndrome de Shock por Dengue (SSD).

Clasificación de Caso

Caso Probable

Todo caso que llene los criterios de una de las descripciones clínicas de caso.

Caso Confirmado

En momentos no epidémicos: caso probable de Dengue clásico, hemorrágico o de SCD confirmado por alguno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico.

En momentos epidémicos declarados por la autoridad sanitaria: se considerarán casos confirmados aquellos que llenen los criterios de caso probable de Dengue clásico, Hemorrágico o SCD, por tanto no es necesario realizar pruebas serológicas al total de casos probables.

ANEXO C. Ficha Epidemiológica para Dengue.

**MINISTERIO DE SALUD
DIRECCION DE EPIDEMIOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA**

FICHA NACIONAL PARA INVESTIGACION DE CASOS SOSPECHOSOS DE DENGUE

1. DATOS EPIDEMIOLOGICOS

Fecha de Registro _____

Departamento de Sucre – Municipio _____ Localidad _____

Dirección _____

Teléfono _____ Nombre _____

Edad ____ Sexo ____ Lugar probable de infección _____

Padeció en el pasado dengue: Sí ____ No ____ Fecha aproximada DIA ____ MES ____ AÑO ____

Donde _____ Hay actualmente casos febriles: En la familia __ En la vecindad __

MADRE _____ **PADRE** _____

2. DATOS CLINICOS

Fecha inicio síntomas y signos: DIA ____ MES ____ AÑO ____

Fecha de consulta: DIA ____ MES ____ AÑO ____ Hospitalización Sí ____ No __

Donde _____ Fecha de Hospitalización: DIA ____ MES ____ AÑO ____

Ambulatorio _____ Fecha recepción muestras INS: DIA ____ MES ____ AÑO ____

MANIFESTACIONES HEMORRAGICAS

Fiebre__ Cefalea__ Dolor Retrocular__ Fotofobia__ Mialgias__ Brote__ Nauseas__ Vómitos__
 Diarrea__ Escalofríos__ Dolor Abdominal__ Astenia__ Adinamia__ Adenopatias__ Petequias__
 Equimosis__ Epistaxis__ Gingivorragia__ Hematemesis__ Metrorragia__ Melenas__
 Hepatomegalias__ Hematuria__

Prueba de Torniquete (1) Positiva__ Negativa__

Prueba de torniquete (2) Positiva__ Negativa__

Tensión Arterial (1) ___/___/ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Tensión Arterial (2) ___/___/ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Tensión Arterial (3) ___/___/ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

3.LABORATORIO CLINICO

Hematocrito (1) __ % Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Hematocrito (2) __ % Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Hematocrito (3) __ % Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Recuento de Plaquetas (1) _____/mm³ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Recuento de Plaquetas (2) _____/mm³ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

Recuento de Plaquetas (3) _____/mm³ Fecha DIA__ MES__ AÑO__

SUEROS

Fecha toma de muestra: DIA__ MES__ AÑO__

Fecha de resultados: DIA__ MES__ AÑO__ Aislamiento viral_____

SEROLOGIA

Suero	Fecha	D1	D2	D3	D4
1					
2					
3					

Diligenciado por _____ Cargo _____

Institución:

Firma _____

Fuente: Hospital Regional de II Nivel de Sincelejo