

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**



**IMPORTANCIA DEL DENGUE EN LA SALUD PÚBLICA Y LAS  
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EMPLEADAS PARA  
SU CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA Y VIGILANCIA  
EPIDEMIOLÓGICA EN EL SALVADOR, EN EL MES DE JULIO  
DE 2023**

**Presentado por:**

**JACKELINE ELIZABETH ZELAYA LOPEZ**

**Para optar el grado de:**

**LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO**

**Asesor**

**Msp. MIRIAM CECILIA RECINOS DE BARRERA**

**Ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, octubre, 2023.**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rector**

*Msc. Roger Armando Arias*

**Vicerrector Académico**

*PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López*

**Vicerrector Administrativo**

*Ing. Juan Rosa Quintanilla*

**Secretario/a General**

*Ing. Francisco Antonio Alarcón*

**AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

**Decana**

*MsC. Josefina Sibrían de Rodríguez*

**Vicedecano**

*Dr. Saúl Díaz Peña*

**Secretaria**

*MsC. Aura Marina Miranda de Arce*

**Director de Escuela**

*MsC. José Eduardo Zepeda Avelino*

**Directora de Carrera**

*Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera*

## **CONTENIDO**

<b>AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR .....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN... ..</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>ix</b>
<b>DESARROLLO.....</b>	<b>1</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>12</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>15</b>

## RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito hembra infectado hacia el ser humano, el vector principal responsable de la transmisión del dengue es el mosquito *Aedes Aegypti* y está ampliamente distribuido en todo el mundo; es una enfermedad que cursa con fiebre y que puede causar la muerte, su fácil propagación hacen que la enfermedad sea un problema de salud pública, esta enfermedad no tiene vacuna y para erradicarla es importante concientizar a toda la población para eliminar los criaderos.

El Ministerio de Salud de El Salvador menciona “Se estima que 3.000 millones de personas tienen el riesgo de contraer dengue, 390 millones de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y 20.000 muertes por dengue al año “lo que genera una gran preocupación.

El diagnóstico del dengue puede realizarse mediante métodos serológicos y moleculares. Para ambas pruebas se necesita una muestra de suero sanguíneo del paciente que se obtiene a través de punción venosa y centrifugación. El método serológico se puede realizar en la fase aguda (cero a cinco días de evolución) y en la fase convaleciente (seis a diez días de evolución).

Desafortunadamente, el aislamiento viral no permite realizar un diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad, debido a que requiere más de 7 días para la obtención de los resultados. Por otro lado, aunque las pruebas serológicas permiten obtener datos en menor tiempo, su uso se limita a la fase convaleciente y depende de la capacidad de respuesta del sistema inmune del individuo y el tiempo de infección para poder obtener títulos detectables de anticuerpos, siendo aún muy difícil a sus serotipos) debido a su posibilidad de reacción cruzada.

Por otro lado, se puede hacer detección por métodos moleculares. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 es un ensayo de amplificación de ácido nucleico que detecta el ARN

de los serotipos 1, 2, 3 o 4 a partir del plasma o suero humano obtenidos de pacientes humanos con signos y síntomas que corresponden a la infección por dengue.

En El Salvador se utilizan las técnicas de biología molecular PCR en tiempo real y PCR Multiplex para determinación de serotipos de dengue estos se realizan en pacientes con fecha de inicio de síntomas y toma de muestra menor a 5 días lo que permite su detección temprana. Pese a sus grandes ventajas de la biología molecular para su diagnóstico es utilizada únicamente para vigilancia epidemiológica y no como diagnóstico inicial.

## **PALABRAS CLAVE**

Biología molecular, Diagnóstico, PCR, Vigilancia epidemiológica

## **ABSTRACT**

Dengue is a viral disease transmitted by the bite of an infected female mosquito to humans. The main vector responsible for the transmission of dengue is the *Aedes Aegypti* mosquito and it is widely distributed throughout the world; this is a disease that occurs with fever that can cause death, the easy spread makes the disease a public health problem, this disease has no vaccine and to eradicate it is important to raise awareness among the entire population to eliminate breeding sites.

The Ministry of Health of El Salvador mentions "It is estimated that 3,000 million people are at risk of contracting dengue, 390 million infections (96 million of them symptomatic) and 20,000 deaths from dengue per year" which generates great concern.

The diagnosis of dengue can be made by serological and molecular methods. For both tests, a sample of the patient's blood serum is needed, which is obtained through venipuncture and centrifugation. The serological method can be performed in the acute phase (zero to five days of evolution) and in the convalescent phase (six to ten days of evolution).

Unfortunately, viral isolation does not allow for a diagnosis in the acute phase of the disease, since it requires more than 7 days to obtain the results. On the other hand, although serological tests allow data to be obtained in less time, their use is limited to the convalescent phase and depends on the response capacity of the individual's immune system and the time of infection in order to obtain detectable antibody titers, still being very difficult to their serotypes) due to their possibility of cross-reactivity.

On the other hand, detection can be done by molecular methods. The DENV-1-4 Real-Time RTPCR Assay is a nucleic acid amplification assay that detects serotype 1, 2, 3, or 4 RNA from human serum or plasma obtained from human patients with signs of and symptoms corresponding to dengue infection

In El Salvador, real-time PCR and Multiplex PCR molecular biology techniques are used to determine dengue serotypes, these are performed on patients with a date of onset of symptoms and sample collection of less than 5 days, which allows early detection. Despite its great advantages of molecular biology for its diagnosis, it is only used for epidemiological surveillance and not as an initial diagnosis.

## **KEYWORDS**

Molecular biology, Diagnosis, PCR, Epidemiological surveillance



## INTRODUCCION

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito hembra infectado hacia el ser humano, la OPS menciona “En las Américas, el vector principal responsable de la transmisión del dengue es el mosquito *Aedes Aegypti* y está ampliamente distribuido en todo el territorio. Su tiempo de incubación oscila entre 2 a 14 días, con un promedio de 3 a 5 días. El periodo de transmisión abarca desde la aparición de los primeros síntomas que anda entre el tercero o quinto día, tiempo donde el virus se encuentra circulando en sangre, y el momento donde la hembra del mosquito pica para luego el virus llevar a cabo su proceso de replicación en su interior en un promedio de 7 a 10 días hasta el momento donde el virus es inoculado en una persona que no ha padecido la enfermedad.

¿Por qué la infección por dengue es un problema de salud pública?

El dengue en la actualidad es un problema de salud pública a nivel mundial y específicamente aquí en nuestro territorio. no se ha logrado su erradicación por diversas dificultades técnicas, siendo la principal: la complejidad de disminuir la presencia del mosquito *Aedes aegypti*, y por ciertas dificultades de participación ciudadana en dicho problema, siendo la principal: que las actividades de control y erradicación del dengue no contemplan el conocimiento previo que las personas tiene sobre el tema, ni la actitud de la población hacia dicho problema, esto último podría significar resultados negativos. El virus se desarrolla en zonas tropicales y subtropicales del mundo; El Salvador se caracteriza por su clima tropical, muy húmedo, propiciando las condiciones favorables para el vector transmisor del virus del dengue. Los mosquitos del dengue se presentan en zonas urbanas con altitudes inferiores a altura 2314 sobre el nivel del mar y una temperatura media entre

20 y 25 c, ponen sus huevos en depósitos de agua limpia como albercas, floreros de plantas acuáticas, llantas, baldes de agua y cualquier recipiente que está a la intemperie y que puede almacenar agua.

En nuestro país es una enfermedad endémica y afecta a la pequeña infancia, niños, personas jóvenes y adultas en todo el mundo. La Organización mundial para la salud menciona “El dengue se encuentra en más de 100 países de las regiones de la OMS de África, las Américas, Asia Sudoriental, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental. Las Regiones de las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental son las más gravemente afectadas y en Asia se concentra alrededor del 70% de la carga mundial de la enfermedad”; y está ampliamente distribuido en todo el territorio. Esta enfermedad puede cursar con síntomas o ser asintomática. Sus síntomas aparecen de 3 a 14 días (en promedio 7 días) después de la picadura infectiva, El dengue se desarrolla en tres fases: aguda, crítica y de convalecencia los síntomas van desde leves entre ellos fiebre alta y síntomas similares a la gripe hasta severos que podrían causar hasta la muerte.

El causante del dengue es un virus de la familia Flaviviridae que tiene cuatro serotipos distintos, aunque estrechamente emparentados. La OPS menciona “Los cuatro serotipos de dengue (DENV1, DENV-2, DENV-3 y DENV- 4) circulan a lo largo de las Américas y en algunos casos circulan simultáneamente” pero ¿cuál es la consecuencia de que existan cuatro serotipos que causan enfermedad? Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo del cual estuvo infectada; la inmunidad cruzada a los otros serotipos tras la recuperación es parcial y temporal. La infección por un serotipo, seguida por otra infección con un serotipo diferente aumenta el riesgo de una persona de padecer dengue grave y hasta morir, haciendo necesaria su identificación no sólo para garantizar un tratamiento oportuno previo al

inicio de las complicaciones de la enfermedad, sino también útil en los programas de vigilancia epidemiológica ya que el virus del dengue es transportado con frecuencia de un lugar a otro por viajeros infectados; siempre que haya vectores sensibles en nuevas zonas sin casos, existe la posibilidad de que se establezca una transmisión local.

” La OMS clasifica el dengue en dos categorías principales: dengue (con o sin signos de alerta) y dengue grave”. La clasificación secundaria de dengue con o sin signos de alerta está concebida para ayudar a los profesionales de la salud a seleccionar pacientes para su ingreso hospitalario, a fin de someterlos a observación estrecha, y reducir al mínimo el riesgo de que evolucionen hacia la forma más grave de dengue.

El dengue se inicia abruptamente después de un periodo típico de incubación de 5 a 7 días, y el curso sigue 3 fases: febril, crítica y convalecencia. En la mayor parte de los casos, el dengue causa síntomas leves o incluso ningún síntoma y se cura en una o dos semanas, pero en casos infrecuentes se agrava y puede causar la muerte.

Se caracteriza por el inicio de una fiebre alta y espontánea que tiene como duración de 2 a 7 días, acompañada de dolores intensos en diferentes partes del cuerpo como dolor de cabeza dolor retro orbitario en los ojos, musculares, articulares e incluso en huesos, otros síntomas que aparecen son náuseas, vómito, erupciones macular o maculopapular, y manifestaciones de hemorragias menores similares a las petequias, equimosis (hematomas), epistaxis, sangrado de encías o hematuria. Hay disociación de la temperatura y de la frecuencia cardíaca, se presenta bradicardia. A nivel de laboratorio hay un descenso de los glóbulos blancos (neutropenia). En ocasiones pueden aparecer eritemas orofaríngeos y facial enrojecido durante las 24 a 48 horas después de la enfermedad.

La Fase Crítica: Comienza entre 3 a 7 días de las enfermedades. En la mayoría de los casos las personas mejoran en esta fase, pero en ocasiones la enfermedad puede evolucionar a gravedad y presentarse extravasación del plasma debido a un aumento de la permeabilidad vascular, a causa de esto, las personas con extravasación podría tener derrame pleural, ascitis, hipoproteinemia, hipotensión seguido de un shock y hemorragias severas, aparte de tener un aumento de hematocrito (con duración de 24 o 48 horas) asociada con manifestaciones hemorrágicas como epistaxis, gingivorragia y en las mujeres en edad productiva (metrorragia y/o hipermenorrea).

Fase de convalecencia: Cuando la extravasación del plasma disminuye, se comienza la fase de convalecencia, durante esta fase se reabsorben líquidos intravenosos extravasados y a medida la persona mejora se estabiliza su estado hemodinámico, y aumento de diuresis. El hematocrito se estabiliza o desciende debido a los efectos de la reabsorción hematocrito se estabiliza o desciende debido a los efectos de la reabsorción de líquidos, el número de glóbulos blancos comienzan a subir después de la desaparición de la fiebre e igual el número de plaquetas aumenta posteriormente de los glóbulos blancos.

El dengue durante el embarazo; durante el embarazo puede haber transmisión perinatal y la infección materna en el periparto podría aumentar la probabilidad de infección sintomática con un promedio de duración de una semana, en caso de transferencia de IgG materna a través de la placenta contra el virus del dengue (de una infección materna anterior) podría incrementar el riesgo de padecer un dengue grave del recién nacido entre los 6 a 12 meses de edad cuando el efecto protector de estos anticuerpos disminuye. (OPS, 2016)

El Ministerio de Salud de El Salvador menciona “Se estima que 3.000 millones de personas tienen el riesgo de contraer dengue, 390 millones de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y

20.000 muertes por dengue al año “lo que genera una gran preocupación.

¿Cuáles son las técnicas empleadas para la confirmación diagnóstica de la infección por dengue?

El diagnóstico del dengue puede realizarse mediante métodos serológicos y moleculares. Para ambas pruebas se necesita una muestra de suero sanguíneo del paciente que se obtiene a través de punción venosa y centrifugación. El método serológico se puede realizar en la fase aguda (cero a cinco días de evolución) y en la fase convaleciente (seis a diez días de evolución).

Desafortunadamente, el aislamiento viral no permite realizar un diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad, debido a que requiere más de 7 días para la obtención de los resultados. Por otro lado, aunque las pruebas serológicas permiten obtener datos en menor tiempo, su uso se limita a la fase convaleciente y depende de la capacidad de respuesta del sistema inmune del individuo y el tiempo de infección para poder obtener títulos detectables de anticuerpos, siendo aún muy difícil serotipificar el DENV (acrónimo oficial para referirse al Dengue y a sus serotipos) debido a su posibilidad de reacción cruzada.

Por otro lado, se puede hacer detección por métodos moleculares. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 es un ensayo de amplificación de ácido nucleico que detecta el ARN de los serotipos 1, 2, 3 o 4 a partir del plasma o suero humano obtenidos de pacientes humanos con signos y síntomas que corresponden a la infección por dengue.

En El Salvador se utilizan las técnicas de biología molecular PCR en tiempo real y PCR Multiplex para determinación de serotipos de dengue estos se realizan en pacientes con fecha de inicio de síntomas y toma de muestra menor a 5 días lo que permite su detección temprana.

En marzo del 2023 El Laboratorio Nacional de Referencia recibió una capacitación en secuenciación genómica para seguimiento de serotipos y epidemiología molecular del virus del dengue.

## DESARROLLO

El dengue es una enfermedad viral transmitida por vectores de mayor importancia en el mundo. Debido a que hasta el momento no existe una vacuna para la prevención de la infección ni una terapia específica para controlar la enfermedad, el diagnóstico temprano y específico resulta ser una herramienta de vital importancia para brindar un tratamiento rápido y oportuno al paciente. Aunque hace más de seis décadas se dispone de una variedad de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de esta enfermedad (técnicas celulares e inmunológicas), es frecuente encontrar que no exista un consenso en el diagnóstico de laboratorio sobre las ventajas y las limitaciones de estas técnicas, lo que dificulta dicho diagnóstico. Adicionalmente, debido a que la mayoría de técnicas que se usan se basan en la respuesta inmune frente al virus, y se pueden presentar reacciones cruzadas con otros virus genéticamente relacionados, la posibilidad de falsos positivos es alta. Principalmente, por esta razón, en los últimos años ha aumentado el desarrollo y la validación de técnicas moleculares, ya que son más sensibles, específicas y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas.

### **Diagnóstico presuntivo y confirmatorio de la infección por dengue**

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en las manifestaciones clínicas, pero el diagnóstico confirmatorio se debe hacer con base en pruebas de laboratorio, ya sean celulares (aislamiento de virus en cultivos) o inmunológicas (detección de IgM en fase aguda o seroconversión en fase convaleciente). Adicionalmente, los avances en técnicas de biología molecular han abierto la posibilidad de un diagnóstico más rápido y específico que podría ayudar

a mejorar el tratamiento de los pacientes y, por consiguiente, a controlar el desarrollo de la enfermedad. En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una agenda de prioridades en investigación de dengue, en la que se recomienda, entre otras cosas, validar las nuevas técnicas de diagnóstico descritas recientemente, haciendo especial énfasis en las moleculares, ya que son más sensibles y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas; además, son una herramienta epidemiológica importante para detectar el serotipo viral, y mediante secuenciación de regiones específicas en el genoma permiten identificar las cepas circulantes, lo que las convierte en una herramienta útil en estudios de evolución viral.

Antes de centrarnos en el diagnóstico de Dengue por técnicas de biología molecular es importante darse cuenta que esta enfermedad es un problema de salud pública. Desde hace algunas décadas, la salud mundial se encuentra afectada por la alta prevalencia de enfermedades transmisibles que llevan a una alta morbilidad y mortalidad, en especial en los países en vía de desarrollo. De las enfermedades transmisibles, las enfermedades emergentes y reemergentes son las más frecuentes a causa del aumento de la población, la alta urbanización y los cambios en factores ambientales, sociales y sanitarios, entre otros aspectos. Las enfermedades transmisibles que afectan tanto a humanos como a animales son causadas principalmente por virus que pueden ser transmitidos a vertebrados mediante la picadura de artrópodos hematófagos; estos virus reciben el nombre de arbovirus. En la última década los artrópodos han sido los responsables de la transmisión de aproximadamente el 30% de las enfermedades emergentes, lo que los convierte en un serio problema de salud pública; ello se debe a la amplia distribución de los vectores y a su capacidad vectorial, descrita como el conjunto de habilidades y características fisiológicas del artrópodo, que ligada a características de tipo ecológico, le permiten transmitir de forma eficiente un patógeno, en este caso, un virus.



De las arbovirosis, el dengue es una de las más frecuentes y constituye un serio problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países tropicales y subtropicales. La distribución del virus dengue es mundial y alrededor de 2,5 mil millones de personas viven en áreas de riesgo para su transmisión. Se estima que en los últimos 50 años la incidencia mundial de esta enfermedad ha aumentado 30 veces y se calcula que cada año se presentan aproximadamente 50 millones de casos de dengue. Según datos de la OPS, cerca de 500 millones de personas en las Américas están actualmente en riesgo de contraer dengue. El número de casos de dengue en las Américas se ha incrementado en las últimas cuatro décadas, en tanto pasó de 1.5 millones de casos acumulados en la década del 80, a 16.2 millones en la década del 2010-2019

En 2013, un año epidémico para la región, se registraron por primera vez más de 2 millones de casos, y una incidencia de 430.8 cada 100 mil habitantes. Se registraron también 37.692 casos de dengue grave y 1.280 muertes en el continente. En 2019 se registraron un poco más de 3.1 millones de casos, 28 mil graves y, 1.534 muertes.

### **Las técnicas moleculares se han convertido en herramientas rápidas y confiables para el diagnóstico de las infecciones virales por dengue.**

Todas estas cifras nos permiten darnos cuenta que el Dengue es un problema de salud y nos permite preguntarnos ¿Qué papel juega la biología molecular en su diagnóstico? La sintomatología que se presenta durante la infección por el virus dengue orienta el diagnóstico clínico, el cual es de tipo presuntivo; sin embargo, muchos de los síntomas también se pueden presentar en infecciones producidas por otros agentes etiológicos, lo que puede llevar a falsos positivos o falsos negativos. Es por ello, que el diagnóstico se debe confirmar mediante pruebas de laboratorio. Por

otra parte, la enfermedad de Dengue es de carácter obligatorio notificar los casos a las instituciones responsables de la vigilancia epidemiológica, en nuestro país El Laboratorio Nacional de Referencia Dr. Max Bloch realiza PCR para vigilancia epidemiológica.

Las técnicas moleculares se han convertido en herramientas rápidas y confiables para el diagnóstico de las infecciones virales, ya que tienen mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas; además, permiten detectar la variabilidad genética del virus a partir de la secuenciación del genoma y por ello, también sirven para estudios epidemiológicos. Entre las técnicas más usadas para la amplificación del genoma viral y que la OMS propone para el diagnóstico, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en los mecanismos celulares de replicación de los ácidos nucleicos; mediante esta técnica se amplifican secuencias virales únicas que se encuentran en las cepas circulantes

Antes de hablar de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de dengue como tal es importante preguntarnos ¿Qué es el diagnóstico molecular? El diagnóstico molecular engloba un conjunto de técnicas de laboratorio que tienen como objetivo principal extraer, identificar y amplificar fragmentos de material genético, ADN y ARN. Estas técnicas se han convertido en una herramienta poderosa para detectar un sinnúmero de enfermedades: desde trastornos genéticos hasta infecciosos. Incluso el diagnóstico molecular ha sido utilizado para la identificación de personas. Esta detección parte del hecho de que la molécula de ADN es única para cada individuo y específica de género y especie. Por lo tanto, este atributo ha permitido implementar técnicas de extracción de material genético y de amplificación para identificar regiones de ADN específicas de microorganismos en muestras clínicas.

El diagnóstico del dengue por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método que se realiza durante la fase aguda de la infección (generalmente puede detectarse en los primeros 7 días del curso de la enfermedad). Este método detecta el material genético del virus (ARN), que previamente fue extraído.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento específico de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados primers u oligonucleótidos, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis, lo que le hizo valedora del premio Nobel en 1993.

Hay diferentes tipos de PCR y para el caso de la identificación del genoma del virus dengue, desde la década de los años noventa se han realizado diversos ensayos que la han propuesto como una técnica diagnóstica rápida.

En los últimos años ha aumentado el número de investigaciones en las que se usan métodos moleculares para confirmar el diagnóstico de los casos sospechosos de dengue. Las técnicas moleculares tienen varias ventajas con respecto a las celulares y serológicas; por ejemplo, son más sensibles y específicas, permiten la detección directa del virus y el resultado se obtiene en poco

tiempo. Además, algunos autores resaltan la importancia que tiene para la vigilancia epidemiológica, específicamente para la serotipificación y la determinación de los serotipos circulantes, ya que las técnicas moleculares pueden ser más confiables que las basadas en anticuerpos, debido a que estas últimas pueden presentar reacciones cruzadas con otros serotipos o incluso con virus de otras familias.

Entre las técnicas moleculares se destaca la PCR con transcripción reversa (RT-PCR), usada sólo para la serotipificación, y la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), usada para la serotipificación y para la evaluación de la carga viral.

La RT-PCR consiste en una transcripción reversa inicial, en la que el ARN viral, mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, se convierte en ADN copia, y a partir de éste se realiza una PCR convencional en la que se amplifica una región conservada del genoma del virus dengue. En general, la técnica RT-PCR consta de tres pasos:

1. Pre-PCR, extracción del ARN a partir de suero de pacientes.
2. Transcripción reversa (ARN a ADN), seguido de la PCR, que puede o no ser anidada.
3. Post-PCR, visualización en un gel. El “punto final” que permite definir si una muestra es o no positiva, es la visualización en el gel, obteniéndose un resultado netamente cualitativo

### **RT-PCR en tiempo real**

La prueba se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) donde un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces. El

producto del PCR (punto final) es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra.

La detección del virus dengue por RT-PCR se usa desde hace más de dos décadas para el diagnóstico y la serotipificación. En años recientes, se ha descrito una técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), la cual permite serotipificar y cuantificar el virus, es decir, determinar la carga viral en el paciente. Las técnicas de PCR en tiempo real combinan los principios de una PCR convencional con el uso de marcadores fluorescentes. En el caso del virus dengue, esta técnica comparte los primeros pasos de una RT-PCR convencional: extracción de ARN y transcripción reversa, pero el “punto final” es diferente, pues no necesita visualización en un gel, sino que se observan las curvas de amplificación y se obtiene un resultado cuantitativo.

El progreso de la amplificación se sigue ciclo por ciclo y los datos son recolectados desde los primeros ciclos de reacción hasta el último. Por lo tanto, permite ver la amplificación en tiempo real (ciclo por ciclo) del material genético del virus dengue.

La detección de la amplificación del material genético es específica y monitoreada mediante la captación de señales de fluorescencia emitidas durante los ciclos de la PCR. La presencia de altas concentraciones de material genético evidencia un incremento en la fluorescencia en los primeros ciclos de la reacción. Por el contrario, bajas concentraciones permiten obtener un incremento de fluorescencia en los últimos ciclos de amplificación.

En esta técnica se emplean cebadores específicos para cada serotipo del virus dengue y fluorocromos como el SYBR Green o sondas tipo TaqMan marcadas con fluorocromos los cuales emiten fluorescencia a medida que se amplifica el genoma viral presente en la muestra.

Por esta razón, la cantidad de fluorescencia que se emite es proporcional a la cantidad de ADN copia inicial de la muestra. Esta prueba puede ser de tipo “singleplex”, en la que se detecta un solo serotipo o “múltiplex”, en la que se identifican los cuatro serotipos. Entre las ventajas que tiene la qRT-PCR se encuentran:

- Disminución del tiempo, pues no necesita el paso postPCR.
- Se puede seguir la reacción en tiempo real.
- No hay riesgo de contaminación post-PCR.
- Permite la cuantificación absoluta o relativa del ARN.
- Su sensibilidad y especificidad son superiores que las de la RT-PCR convencional.
- En el caso de la serotipificación, se puede realizar una “qRT-PCR multiplex”, es decir, en una sola muestra se pueden evaluar o detectar los cuatro serotipos y se obtiene una cuantificación relativa del título viral
- Adicionalmente, como se ha postulado que la carga viral puede ser un factor determinante en la evolución de la enfermedad a formas severas, la técnica de qRT-PCR tendría no solo importancia para mejorar el diagnóstico de la infección, sino que permitiría establecer el pronóstico de la enfermedad.

Los protocolos de la PCR en tiempo real pueden diseñarse para obtener resultados cualitativos, así como demostrar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN o ARN o resultados cuantitativos calculando el número de copias de ADN, que, al compararse con una curva estándar, establece la cantidad de microorganismos presentes en una muestra determinada o bien determinar el número de moléculas de un ARN para designar la expresión de este, por ejemplo.

La gran ventaja de esta técnica es la flexibilidad en su diseño operativo ya que permite la detección cualitativa o cuantitativa del ácido nucleico dependiendo del propósito por lo cual la prueba es solicitada.

### **PCR múltiplex**

La PCR múltiple es otra variante de la PCR que detecta material genético de dos o más cepas de microorganismos en una sola prueba.

El ensayo múltiplex CDC DENV-1-4 rRT-PCR es una prueba de ácido nucleico (NAT) para la detección y tipificación del virus del dengue (DENV) en casos sospechosos y sintomáticos aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para su uso en los Estados Unidos y está siendo utilizado actualmente por El Laboratorio Nacional de Referencia en nuestro país. Este ensayo detecta los serotipos 1, 2, 3 o 4 del DENV que, a pesar de ser genéticamente muy parecidos, presentan pequeños cambios en el ARN. Esto se realiza a partir de suero o plasma humano recolectado de pacientes humanos con signos y síntomas compatibles con la infección por dengue. El ensayo está diseñado para usarse como prueba de diagnóstico en pacientes y no está aprobado para la detección en bancos de sangre.

Para el diagnóstico de dengue por RT-PCR múltiple es necesario:

1. ARN del virus del dengue extraído de muestras clínicas de pacientes en la fase aguda de la infección.

2. Cebadores: fragmentos de ADN que sirven como punto de partida para la replicación y que son específicos para detectar el virus del dengue.
3. Enzima retrotranscriptasa: que contiene el ARN en cADN.
4. Enzima polimerasa, que produce la cadena complementaria del material genético buscado (templado).
5. Buffer, que contiene sales que estabilizan la mezcla de reacción y son sustrato de la polimerasa.
6. Cuatro sondas marcadas con fluorescencia para cada uno de los cuatro serotipos de dengue, que permitirán observar la amplificación ciclo por ciclo.
7. Termociclador, equipo con capacidad de calentar y enfriar rápidamente.

Todos estos reactivos conforman una mezcla de reacción que se coloca en el termociclador para llevar a cabo la PCR. Este proceso consiste en una serie de cambios de temperatura (ciclos) que se repite hasta 45 veces y consiste principalmente en tres etapas:

- Desnaturalización del material genético (95°C)
- Alineación de los cebadores (50°)
- Extensión, donde se genera la cadena complementaria o templado (70°) **¿Cómo se**

### **observan los resultados?**

Los valores de amplificación se expresan en valores de Ct (del inglés Cycle Threshold). Un Ct es el ciclo a partir del cual los valores de fluorescencia relativa (UFR) rebasan el punto de corte o umbral. El valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ARN o ADN. La amplificación se observa como una curva sigmoide y se interpreta de la siguiente manera:



- Muestra con valor de Ct  $\leq$  35: positivo (se identifica el serotipo o serotipos)
- Muestra con valor Ct  $\geq$  39: negativo

Es importante mencionar que el diagnóstico molecular ofrece una alta sensibilidad, especificidad y rapidez con mínimos requerimientos de muestra. Esto en comparación con las técnicas de diagnóstico clínico convencionales.

Tras expresar la importancia de las técnicas de biología molecular ¿Cuál es la situación epidemiológica actual (2023) en nuestro país? Según el boletín epidemiológico publicado por el Ministerio de Salud, nos revela que hasta la fecha no se han reportado muertes por dengue. Los datos que se presentan a continuación son gracias a los sistemas de vigilancia del dengue que tienen la finalidad de detectar la circulación de virus específicos en las poblaciones humanas o de mosquitos. Las herramientas de diagnóstico utilizadas deben ser sensibles, específicas y accesibles para el país. Como se describió anteriormente, el laboratorio responsable en nuestro país es El Laboratorio Nacional de Referencia.

	Año 2022	Año 2023	Diferencia de casos 2023-2022
Casos Sospechosos (SE 1-4)	631	292	-339
Casos probables de dengue (SE 1-4)	1	0	-1
Casos confirmados con y sin signo de alarma (SE 1-3)	0	0	0
Casos confirmados dengue grave (SE 1-3)	1	0	-1
Total casos confirmados dengue (SE 1-3)	1	0	-1
Hospitalizaciones acumuladas (SE 1-4)	88	41	-47
Fallecidos (SE 1-4)	0	0	0

## CONCLUSIONES

- El dengue es un reto para la salud pública en el mundo ya que más de 2 500 millones de personas -es decir, más de dos quintas partes de la población mundial- viven en zonas en riesgo de dengue y más de 100 países han informado de la presencia de esta enfermedad en su territorio
- La Región de Las Américas ha sido una de las más afectadas por el dengue y su forma más grave, el dengue hemorrágico.
- Hasta el momento se han descrito cuatro serotipos de este virus que circulan principalmente en países del sudeste asiático, del Pacífico occidental y de América Latina y el Caribe, por lo que la enfermedad se considera tropical.
- La infección por un serotipo, seguida por otra infección con un serotipo diferente aumenta el riesgo de una persona de padecer dengue grave y hasta morir.
- El sector de la salud debe desempeñar un papel protagónico en la dirección de las campañas de lucha antivectorial, la vigilancia epidemiológica para la detección temprana de los brotes y la capacitación del personal médico para lograr un diagnóstico oportuno y certero que evite muertes.
- Aunque todavía no existen condiciones para erradicar el vector, es posible aplicar medidas de control intensivas que eviten las epidemias
- Si bien El Ministerio de Salud desempeña un papel determinante en las actividades de orientación, la educación de la población y el control de los programas nacionales, es preciso insistir en que la participación responsable de la comunidad puede y debe

contribuir a eliminar los principales criaderos del vector, ya que están ligados al hábitat del ser humano y son producto de su actividad.

- El diagnóstico definitivo de infección por dengue, se hace en el laboratorio y depende de la detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente, de la detección del antígeno viral o el RNA viral en el suero o tejido o el aislamiento viral.
- Debido a que la mayoría de técnicas que se usan se basan en la respuesta inmune frente al virus, y se pueden presentar reacciones cruzadas con otros virus genéticamente relacionados, la posibilidad de falsos positivos es alta.
- En los últimos años ha aumentado el desarrollo y la validación de técnicas moleculares, ya que son más sensibles, específicas y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas.
- Debido principalmente a la infraestructura, equipamiento y personal requerido para la implementación de técnicas moleculares, el diagnóstico de dengue se realiza principalmente a partir de pruebas serológicas, técnica que provee información cuando los pacientes ya han pasado el cuadro clínico, limitándose su relevancia a la vigilancia epidemiológica y estudios virológicos posteriores.
- Las técnicas de RT-PCR y PCR convencional, son una excelente alternativa de detección y tipificación del DENV, debido a que permiten obtener resultados en pocas horas, siendo su sensibilidad mayor al detectar pocas copias del genoma viral en el suero del paciente, inclusive provenientes de partículas virales inactivadas o unidas a anticuerpos.

- El análisis de muestras clínicas de sangre (suero o plasma) con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC no debe realizarse a menos que el paciente cumpla con los criterios clínicos y/o epidemiológicos para analizar casos sospechosos de dengue. No se ha establecido el desempeño de esta prueba para el monitoreo del tratamiento del dengue.
- No se han establecido las características de desempeño del ensayo RT-PCR en tiempo real, para el análisis prenatal ni para el análisis de la población en general sin síntomas que correspondan a la fiebre del dengue.
- RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC Los resultados negativos no excluyen que haya ocurrido una infección por virus del dengue y no deben utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo de pacientes
- Se deberá volver a analizar una muestra negativa recolectada entre el 3.º y 7.º día después de la aparición de la enfermedad febril con una prueba de IgM anti-DENV; esto se realiza para aumentar la probabilidad de obtener el diagnóstico de dengue.
- Puede obtenerse un resultado negativo falso si una muestra se recolecta, transporta o maneja de forma inadecuada. La presencia de inhibidores de amplificación o una baja concentración de partículas virales pueden producir resultados negativos falsos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Castaño G, E. (2015). Guía de actuación en infección por dengue. *Pediátr. Panamá*, 34-40. <http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/gaagt>
2. CDC. (2019a, septiembre 5). Cuadro clínico del dengue | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcareproviders/clinicalpresentation.html>
3. CDC. (2019b, diciembre 17). Guía para la realización de pruebas Dengue | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/testing/testing-guidance.html>
4. CDC. (2021, septiembre 20). Síntomas y tratamiento del dengue | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dengue/es/symptoms/index.html>
5. CDC. (2022, junio 21). Ciclos de vida de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes Albopictus* | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html>.
6. Santana, S. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Biblioteca Médica Nacional. (2022). Dengue. Diagnóstico. Tratamiento. Medicina alternativa. *Bibliomed Suplemento Especial*.
7. Facultad de Química. (2022, 4 de agosto). *PCR en tiempo real - Facultad de Química* . Facultad de Química. <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-lainvestigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>

**8. Organización Mundial de la Salud (2009) Dengue Guías para el Diagnóstico, tratamiento, prevención y control**

**<https://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/ndeng31570.pdf>**

**9. CDC(2013, 5 de enero) Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4**

**<https://www.cdc.gov/dengue/resources/rt-pcr/CDCPackageInsert-spanish.pdf>**

**10. Dirección general de epidemiología (2018). Panorama Epidemiológico de Dengue. Secretaria de salud <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/panoramaepidemiologico-de-dengue-2018>**

**11. Universidad de Antioquia, Edimeco (2012). Medicina & Laboratorio: Programa de Educación Médica Continua Certificada .Actualización en diagnóstico del dengue: evolución de las técnicas y su aplicación real en la clínica**

**<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2012/myl129-10b.pdf>**

**12. Asociación de médicos de sanidad exterior A.M.S.E. (2012). Dengue, Epidemiología y situación mundial <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/71-dengueepidemiologia-y-situacion-mundial>**

**13. Organización Panamericana de la salud(2001) El control de las enfermedades transmisibles <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2010/9275315817.pdf>**

**14. Blacksell, SD, Bell, D., Kelley, J., Mammen, MP, Jr, Gibbons, RV, Jarman, RG, Vaughn, DW, Jenjaroen, K., Nisalak, A., Thongpaseuth, S., Vongsouvath, M., Davong, V., Phouminh, P., Phetsouvanh, R., Day, NPJ y Newton, PN (2007). Estudio prospectivo para determinar la precisión de los ensayos serológicos rápidos para el diagnóstico de la**

infección aguda por el virus del dengue en Laos. Inmunología clínica y de vacunas

<https://doi.org/10.1128/CVI.00482-06>

15. Dehesa LE, Gutiérrez AAFA. (2019). Dengue: actualidades y características

epidemiológicas en México. Rev. MedUAS <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v9.n3.006>

16. Rev. Méd. Urug. vol.32 no.1 Montevideo abr. 2016 Dengue en adultos: diagnóstico, tratamiento y abordaje de situaciones especiales

[http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902016000100006](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902016000100006)

17. Thomas M. Yuill , PhD, University of Wisconsin-Madison ago. 2021 Dengue

<https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/arbovirusarenavirus-y-filovirus/den>

18. Ministerio de Salud de El Salvador ago. 2012. Lineamientos Técnicos para el abordaje del dengue

[http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/lineamientos/Lineamientos\\_tecnicos\\_para\\_el\\_abordaje\\_d](http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/lineamientos/Lineamientos_tecnicos_para_el_abordaje_d)

19. Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F. \*\* Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdia/ir-2013/ir132d.pdf>

**20. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) vol.34 suppl.0 San José Jan. 1999.**

**Diagnóstico clínico y de laboratorio del paciente con dengue**

**[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-)**

**85461999000100004**