

UNIVERSIDAD GALILEO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
LICENCIATURA EN QUÍMICA BIOLÓGICA

**“Detección de ARN del virus Dengue, Chikungunya y Zika por diagnóstico  
molecular y serológico en pacientes sintomáticos en el laboratorio clínico  
Los Almendros, Morales Izabal”**



TESIS

PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

POR

**ANDREA CAROLINA CHOJOLÁN ROJAS**

**LUISA FERNANDA PALENCIA DÍAZ**

PREVIO A CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

**QUÍMICO BIÓLOGO**

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

**LICENCIADO**

GUATEMALA, MAYO DE 2,019

## Índice General

INTRODUCCIÓN.....	12
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
Definición del Problema.....	14
Delimitación del Problema.....	15
Unidad de Análisis.....	15
Tamaño de la Muestra.....	15
Ámbito Geográfico.....	15
CAPITULO II.....	16
MARCO TEÓRICO.....	16
Dengue.....	16
Historia.....	17
Epidemiología.....	18
Patogenia.....	20
Manifestaciones Clínicas.....	20
Dengue Clásico.....	20
Dengue Hemorrágico.....	20
Estructura del virus del dengue.....	22
Proteínas estructurales.....	22
Proteína C.....	22
Proteína precursora de membrana.....	23

Proteína de membrana .....	23
Proteína de envoltura E .....	23
Proteínas no estructurales .....	24
Proteína NS1 .....	24
Proteína NS2A .....	24
Proteína NS2B .....	24
La proteína NS3.....	24
Entrada del ciclo intracelular .....	24
Chikungunya.....	26
Historia.....	26
Epidemiología .....	27
Manifestaciones clínicas .....	28
Enfermedad Aguda .....	28
Manifestaciones atípicas .....	29
Manifestaciones subaguda y crónica .....	29
Manifestaciones en el recién nacido .....	30
Estructura del virus Chikungunya.....	30
Proteínas Estructurales.....	30
Glicoproteínas transmembranales tipo I, E2 y E1.....	30
Cápside viral .....	30
Entrada del Ciclo Intracelular .....	30
Zika.....	33
Historia.....	35
Epidemiología .....	36

Distribución Geográfica .....	37
Tendencia .....	37
Patogenia.....	38
Manifestaciones clínicas .....	38
Formas Sintomáticas .....	38
Síndrome Guillain-Barré.....	39
Complicaciones del Zika en embarazadas .....	39
Estructura del virus del Zika .....	40
Proteínas estructurales .....	40
Proteínas E y M .....	40
Proteínas E y M .....	40
Proteínas no estructurales .....	40
Proteína NS1 .....	40
Proteína NS2A .....	41
Proteína NS3 .....	41
Proteína NS4A .....	41
Proteína NS4B .....	41
Proteína NS5 .....	41
Entrada del ciclo celular .....	41
Pruebas utilizadas para la detección de Arbovirus .....	42
Pruebas Serológicas .....	42
Pruebas Moleculares PCR.....	43
PCR en tiempo real.....	44
Transporte y Almacenamiento de muestras .....	49

Almacenamiento de muestras .....	49
Transporte de muestras .....	50
Sistema de transporte .....	50
HIPÓTESIS .....	52
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	52
Objetivo General .....	52
Objetivos Específicos .....	52
METODOLOGÍA .....	53
Recolección de muestras.....	53
Trasporte de muestras.....	53
Análisis de muestras.....	53
Recursos Financieros .....	55
CAPÍTULO III.....	56
RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN.....	56
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	66
CONCLUSIONES .....	69
RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS.....	78
APENDICES.....	118

## Índice de Imágenes

Serotipos .....	16
Tasa incidencia acumulada por área de salud, Guatemala 2017-2018, S.E. 1-2019	
Mapa de Incidencia.....	19
Proteína de envoltura E .....	23
Entrada del Ciclo Celular .....	25
Tasa de incidencia Acumulada por área de salud Chikungunya .....	27
Modelo de la multiplicación de los alphavirus y su expresión genética .....	31
Casos y Tasas Acumulados por habitantes Zika .....	36
Casos de Zika sospechosos y confirmados por semana epidemiológica en Guatemala. Semana Epidemiológica 41 del 2015 a Semana Epidemiológica 31 del 2017 .....	37
Tasa de incidencia de casos de Zika por 100,000 habitantes por edad y sexo en Guatemala. Semana Epidemiológica 1 a Semana Epidemiológica 28 de 2017 ...	38
Curva de amplificación.....	48
Pico de amplificación .....	49
Microtubos eppendorf .....	50
Nunc Labtopcoolers .....	51
Hielera eléctrica.....	51

## Índice tablas

Tabla 1 Detección de dengue por edad método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics .....	56
Tabla 2 Detección de Dengue por género método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics .....	57
Tabla 3 Detección de Chikungunya por edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	58
Tabla 4 Detección de Chikungunya por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	59
Tabla 5 Detección de Zika por edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	60
Tabla 6 Detección de Zika por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	61
Tabla 7 Distribución de la muestra por edad.....	62
Tabla 8 Distribución de la muestra por género.....	63
Tabla 9 Detección de Dengue por género método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue .....	64
Tabla 10 Detección de Dengue por edad método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue .....	65

## Índice Gráficas

Gráfica 1 Detección de dengue por rango de edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	56
Gráfica 2 Detección de Dengue por sexo método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	57
Gráfica 3 Detección de Chikungunya por rango de edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	58
Gráfica 4 Detección de Chikungunya por sexo método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	59
Gráfica 5 Detección de Zika por rango de edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	60
Gráfica 6 Detección de Zika por sexo método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics .....	61
Gráfica 7 Distribución de la muestra por rango de Edad .....	62
Gráfica 8 Distribución de la muestra por Sexo .....	63
Gráfica 9 Detección de Dengue por sexo método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue .....	64
Gráfica 10 Detección de Dengue por rango de edad método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue .....	65



## Índice Anexos

Anexo 1 Muestras Detectables para DENV .....	78
Anexo 2 Control positivo para Dengue.....	79
Anexo 3 Control Negativo .....	80
Anexo 4 Control Positivo Interno (IPC o IC) .....	81
Anexo 5 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 10 – 19.....	82
Anexo 6 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 20-29 .....	83
Anexo 7 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 30-40 .....	84
Anexo 8 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 41-CP .....	85
Anexo 9 Muestra Detectable para DENV No. 7 .....	86
Anexo 10 Muestra Detectable para DENV No. 8.....	87
Anexo 11 Muestra Detectable para DENV No. 12.....	88
Anexo 12 Muestra Detectable para DENV No. 13.....	89
Anexo 13 Muestra Detectable para DENV No. 15.....	90
Anexo 14 Muestra Detectable para DENV No. 16.....	91
Anexo 15 Muestra Detectable para DENV No. 17.....	92
Anexo 16 Muestra Detectable para DENV No. 21.....	93
Anexo 17 Muestra Detectable para DENV No. 22.....	94
Anexo 18 Muestra Detectable para DENV No. 26.....	95
Anexo 19 Muestra Detectable para DENV No. 27.....	96
Anexo 20 Muestra Detectable para DENV No. 28.....	97
Anexo 21 Muestra Detectable para DENV No. 30.....	98
Anexo 22 Muestra Detectable para DENV No. 31.....	99
Anexo 23 Muestra Detectable para DENV No. 32.....	100
Anexo 24 Muestra Detectable para DENV No. 36.....	101
Anexo 25 Muestra Detectable para DENV No. 39.....	102
Anexo 26 Muestra Detectable para DENV No. 40.....	103
Anexo 27 Muestra Detectable para DENV No. 41.....	104
Anexo 28 Control positivo para CHICKV .....	105
Anexo 29 Control positivo para ZIKV .....	106
Anexo 30 Control Positivo Interno (IPC o IC) ZIKV .....	107
Anexo 31 Muestras analizadas por medio de PCR tiempo real para los tres virus .....	108
Anexo 32 Comparación de síntomas de pacientes para dengue Detectable por medio de PCR tiempo real.....	110
Anexo 33 Análisis de muestras por medio del Ct para virus dengue PCR en tiempo real.....	112
Anexo 34 Análisis de muestras por medio serológico de inmunocromatografía para virus del Dengue marca Biotech CTK Dengue.....	113

Anexo 35 Comparación entre PCR tiempo real y método serológico Inmunocromatográfico para virus dengue.....	115
Anexo 36 Se Muestran las cantidades de reactivos que se necesitan para 1, 9,32 y 64 pocillos para el mastemix .....	117

## Índice de Apéndices

Apéndices 1 Hielera eléctrica.....	118
Apéndices 2 Transporte de muestras .....	118
Apéndices 3 Nunc Labtopcoolers .....	119
Apéndices 4 Temperatura.....	119
Apéndices 5 Prueba rápida.....	119
Apéndices 6 Termociclador .....	119

## **i. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad existen virus transmitidos de animales a hombre por medio de vectores biológicos, los cuales pueden ser artrópodos, quienes además de cumplir un ciclo biológico del parásito dentro de ellos, actúan como puerta de salida para la transmisión de algunas enfermedades como Dengue, Chikungunya y Zika transmitidas por *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Los arbovirus son una clasificación de virus con distintas características morfológicas pero similitud en sintomatología.

En morales, Izabal se encuentran casos de Dengue y Dengue hemorrágico durante todo el año provocando malestares a los pacientes portadores, según SIGSA no existe evidencia de casos de Chikungunya y Zika debido a que los establecimientos de salud no reportaron durante el año 2018.

Los pacientes que asistieron al Laboratorio clínico los Almendros durante el periodo de Abril - Octubre del año 2018, se les preguntó sintomatología común con los tres virus de estudio y si anteriormente habían padecido alguna de las enfermedades. De las muestras recolectadas, algunas se descartaron por no cumplir con por lo menos 3 de los criterios de inclusión o que la muestra estuviera lipémica.

Se realizó un tamizaje de pacientes sintomáticos de Dengue, utilizando técnicas de biología molecular e inmunocromatografía, para establecer la cantidad de pacientes portadores de infección que asisten al Laboratorio Clínico Los Almendros, y determinar si existen casos con el virus Chikungunya y Zika por medio de Biología Molecular.

Se correlacionó la prueba de biología molecular con inmunocromatografía para virus dengue, debido a la expresión tardía de anticuerpos detectados en prueba inmunocromatográfica.

## **CAPITULO I MARCO METODOLÓGICO**

### **1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Dengue, Chikungunya y Zika son enfermedades prevalentes en los trópicos y son un problema de salud pública en Guatemala, son enfermedades que actualmente han tenido un aumento significativo en el país; Zika ha sido declarado por la OMS una enfermedad de problemática global, es el único arbovirus que ha sido relacionado con efectos teratogénicos. Chikungunya es una enfermedad que tiene similitud con las manifestaciones clínicas de Dengue y Zika, que al mismo tiempo comparte el mismo vector y semejantes características epidemiológicas, si bien no es un flavivirus, como los antes mencionados, comparten características que son importantes de diferenciar.

Tomando en cuenta que Guatemala tiene una elevada presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, y está demostrada la circulación de los tres virus Dengue, Chikungunya y Zika, existe un gran número de pacientes infectados por alguno de estos virus, así como también coinfecciones, debido a que existe un gran problema de incremento de virus y una deficiencia de técnicas moleculares. Por lo que es importante aplicar una técnica molecular, debido a que es más específica y sensible, que una prueba de inmunocromatografía.

El diagnóstico definitivo de infección por dengue, es hecho solamente en el laboratorio y depende del aislamiento viral, de la detección del antígeno viral o el RNA viral en el suero o tejido, o detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente.

Para Chikungunya y Zika aún no se cuenta en el mercado una prueba de inmunocromatografía similar a la de Dengue. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad requieren tecnologías más complejas y los

conocimientos técnicos, mientras que las pruebas rápidas pueden comprometer la sensibilidad y especificidad brindando facilidad de rendimiento y velocidad.

El aislamiento del virus y la detección de ácidos nucleicos son más complejos y costosos, pero tienen mayor especificidad y sensibilidad comparada con la detección de anticuerpos por medio de métodos inmunocromatográficos.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En Guatemala Dengue es una de las enfermedades más comunes en el año 2017 se reportaron 4.116 casos(8), Chikungunya se reportaron 349 casos sospechosos(9) y Zika en Guatemala a partir del 2015-2018 se reportaron 3,907 casos sospechosos, 1,032 casos confirmados y 140 casos confirmados de síndrome congénito asociado con Zika(10).

Por lo que es necesario un tamizaje paralelo de pruebas moleculares y serológica para aumentar la captación de casos realmente positivos para virus Dengue.

Determinar por Biología Molecular si existen casos de Chikungunya y Zika en el Laboratorio Clínico los Almendros de Morales Izabal.

### **2.1 Definición del Problema**

No hay evidencia alguna de que el área de salud de Izabal cuente con registros de tamizajes por medio de biología molecular en la población, para evitar la propagación de las infecciones por estos virus. Lo cual afecta significativamente la calidad de vida de la población en Izabal, lo cual no permite que puedan llevar un tratamiento o monitoreo médico adecuado.

## **2.2 Especificación del Problema**

Falta de tamizaje con método de Biología Molecular sensible y específico que permita el desarrollo de una estrategia a nivel salud pública para evitar daños en la población que asiste al Laboratorio Clínico los Almendros de Morales Izabal.

## **2.3 Delimitación del Problema**

### **2.3.1 Unidad de Análisis**

Plasma con EDTA congelado a – 20°C, muestra recolectada en el Laboratorio los Almendros de Morales Izabal.

### **2.3.2 Tamaño de la Muestra**

49 muestras: pacientes masculinos y femeninos de 5 a 80 años que se presenten como parte del público que atiende el laboratorio clínico los Almendros que tengan por lo menos 3 de los siguientes criterios de inclusión:

- Fiebre
- Vómito, diarrea
- Conjuntivitis
- Dolor de cabeza
- Dolor en las articulaciones
- Dolores musculares
- Dolor detrás de los ojos
- Sarpullido o Rash

### **2.3.3 Ámbito Geográfico**

Laboratorio clínico los Almendros del departamento de Morales Izabal.

## CAPITULO II

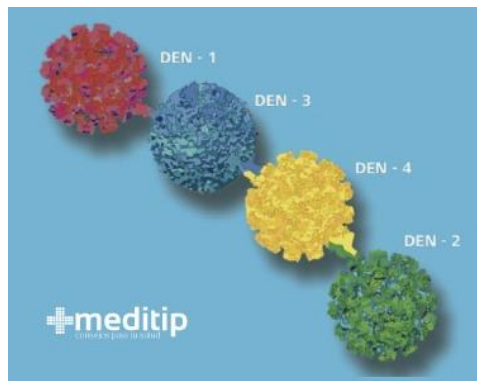
### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Dengue

El Dengue es una enfermedad viral, de carácter endémico-epidémico, transmitida por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti*, el Dengue tiene diversas formas de expresión clínica que van desde fiebre indiferenciada (frecuente en niños), fiebre con cefalea, malestar general, dolores osteomioarticulares, con o sin exantema, leucopenia y sangrado. (11)

El Dengue se ha convertido en un importante problema de salud internacional que afecta a las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente las zonas urbanas y periurbanas. La distribución geográfica del Dengue, la frecuencia de los ciclos epidémicos y el número de casos de dengue han aumentado considerablemente durante las últimas dos décadas. Además, la frecuencia de una complicación potencialmente letal del dengue, llamado fiebre hemorrágica del Dengue ha comenzado a ocurrir con más frecuencia.(12)

La fiebre del dengue es causada por cuatro virus distintos, pero estrechamente relacionados llamados serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) y transmitidos a los humanos a través de las picaduras de mosquitos infectados siendo *Aedes aegypti* es el principal vector.(12)



#### 1 Serotipos



### 1.1.1 Historia

Desde la antigüedad se han descrito casos de epidemia por dengue y que han llegado a afectar a la población en general, causando catástrofes de diversas magnitudes. Aunque no se sabe el alcance de las epidemias se han evidenciado dentro de la historia humana episodios que han tenido un récord, dentro de los cuales podemos mencionar:

- 1000 b.c.: En China se reportó una epidemia con síntomas parecidos a los del dengue.
- 1779: Se reportan las primeras epidemias en Asia, África y América del Norte.
- 1950: Se produce la primera epidemia de dengue hemorrágico en el Sureste Asiático.
- 1975: El dengue se convirtió en la causa frecuente de hospitalización y muerte de los niños de muchos países.
- 1978: Se detectaron los primeros casos de Dengue en Guatemala.
- 1988: Sucedió la aparición de brotes en 8 departamentos de Guatemala.
- 1992: El brote se diseminó a la costa sur, región central, oriente del país y Petén.
- 2009-2010 y 2014-2015: Se han dado años altamente epidémicos en Guatemala.

Actualmente son frecuentes las epidemias causadas por serotipos múltiples, se ha ampliado su distribución geográfica.(13)

### **1.1.2 Epidemiología**

En Guatemala el 8 de noviembre de 2015 las autoridades indicaron que se reportaron nueve muertos por dengue hemorrágico y 14 mil 600 casos por dengue clásico, seis de los fallecidos ocurrieron en Escuintla.

Las otras tres muertes se registraron en los departamentos de Guatemala, Santa Rosa y Petén, durante el año 2014 se registraron 12 mil 353 casos de dengue clásico, según las autoridades. (14)

Durante el 2015 Guatemala declaró "Estado de emergencia sanitaria" a través del acuerdo ministerial número 152-2015, en el que se priorizó la vigilancia, atención, movilización de recursos y monitoreo en el combate del mosquito transmisor en los departamentos de Guatemala, Santa Rosa, Retalhuleu, Quetzaltenango, Petén, Escuintla y Zacapa.

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) con el apoyo técnico de la OPS/OMS Guatemala, trabaja en el fortalecimiento de la EGI-Dengue, en intensificar acciones de control y prevención en las áreas de mayor riesgo, proporcionar asistencia y acompañamiento a las áreas de salud que presentan mayor problemática en términos de acceso, manejo de pacientes y desarrollo de actividades de prevención y control. (15)

El 29 de septiembre de 2017 más de 600 casos de dengue se han detectado, en el departamento de Zacapa. De estos 148 han ocurrido solo en la cabecera departamental, tres de estos casos terminaron en la muerte de dos menores de edad, un niño de 3 años y un bebé de 5 meses. (16)

Las primeras cuatro áreas de salud representan el 48 % de los casos (369/771); de la semana 1 a 20 del año 2018, 11 áreas de salud se encuentran por arriba de tasa país de 4,55 por 100000 habitantes. Los casos reportados durante la semana epidemiológica suman 771.

Se reporta decremento de 30,09 % entre los casos de 2018 y 2017, 17 área de salud no reportaron ningún caso en la semana veinte del año 2018. No se reporta ningún caso fallecido por Dengue Grave.

## 2 Tasa incidencia acumulada por área de salud, Guatemala 2017-2018, S.E. 1-20

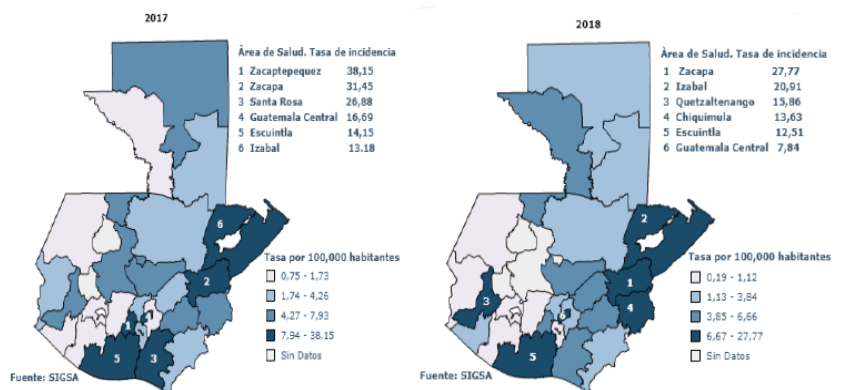
Dengue  
Casos y tasas acumulados  
Guatemala 2017 - 2018 S.E. 20

Área de Salud	Casos de la semana 20		2017		2018	
	2017	2018	Casos	Tasas	Casos	Tasas
Zacapa	9	2	77	31,45	68	27,77
Izabal	6	6	63	13,18	100	20,91
Quetzaltenango	0	0	54	5,99	143	15,86
Chiquimula	3	5	32	7,52	58	13,63
Escuintla	12	3	112	14,15	99	12,51
Guatemala Central	9	0	166	16,69	78	7,84
Ei Progreso	0	0	7	3,99	11	6,27
Santa Rosa	3	3	105	26,88	23	5,89
Sacatepéquez	2	3	136	38,15	19	5,33
Petén Sur Occidental	1	0	5	1,71	15	5,12
Ixcán	0	0	6	5,05	6	5,05
Baja Verapaz	0	0	25	7,93	13	4,13
Jalapa	0	2	18	4,79	15	3,99
Guatemala Nor Occidente	2	0	33	3,92	31	3,68
Petén Sur Oriental	1	0	9	3,64	7	2,83
Guatemala Nor Oriente	2	0	4	0,75	13	2,44
Petén Norte	1	0	14	5,72	4	1,64
Alta Verapaz	1	1	54	4,05	21	1,58
Jutiapa	1	0	17	3,45	7	1,42
Retalhuleu	1	0	6	1,73	4	1,15
Suchitepéquez	6	0	9	1,51	6	1,01
Chimaltenango	0	0	9	1,24	6	0,83
Huehuetenango	0	0	21	1,58	11	0,83
San Marcos	7	0	50	4,26	7	0,60
Guatemala Sur	1	1	22	2,04	5	0,46
Soloá	4				1	0,19
Ei Quiché	2	0	41	4,86		
<b>Total País</b>	<b>74</b>	<b>29</b>	<b>1103</b>	<b>6,51</b>	<b>771</b>	<b>4,55</b>

Fuente: SIGSA

## 3 Mapa de Incidencia

Las áreas de salud con mayor incidencia a la semana 20/2018 son: Zacapa, Izabal, Quetzaltenango, Chiquimula, Escuintla, y Guatemala Central, con rango de tasas entre 27,77



a 7,84 por 100000 habitantes, mencionadas en orden descendente. Y en el 2017 presentaron la misma incidencia las áreas de salud de: Sacatepéquez, Zacapa, Santa Rosa, Guatemala Central, Escuintla e Izabal.

### **1.1.3 Patogenia**

#### **1.1.3.1 Manifestaciones Clínicas**

##### **1.1.3.1.1 Dengue Clásico**

La infección asintomática y la fiebre indiferenciada son las manifestaciones más comunes del virus del dengue y representa 50%- 80% de los casos. La enfermedad tiene un período de incubación de dos a siete días, comienza de forma característica con fiebre de aparición brusca, escalofríos, mialgias intensas que explican la denominación popular de “fiebre quebrantahuesos”. Los pacientes pueden referir también artralgias, pero sin verdadera artritis detectable. La cefalea es frecuente y en ocasiones intensa y va acompañada de dolor retro-orbitario. La duración de los síntomas es bastante variable, pero en general es de dos a cinco días, con una evolución bifásica en algunos casos.

Algunas veces se produce una meningitis aséptica. Aunque en algunos casos pueden existir faringitis o signos radiológicos de infiltrados pulmonares, estos virus no son patógenos respiratorios importantes. El diagnóstico diferencial comprende la leptospirosis anictérica, las rickettsiosis y los primeros estadios de otros síndromes febriles en general. La enfermedad acaba con una recuperación completa, aunque se han descrito algunos casos con astenia y otros síntomas inespecíficos persistentes.(17)

##### **1.1.3.1.2 Dengue Hemorrágico**

Los principales mecanismos fisiopatológicos del dengue hemorrágico son:

- **Formación de anticuerpos antivíricos desprovistos de un papel protector.**

Inducida por la invasión previa de un serotipo heterólogo del virus del dengue, pero a pesar de esto, se unen a la superficie del virión y tras su interacción, el receptor Fc (glicoproteína que se encuentra en la superficie de algunas células que contribuyen a la función protectora del sistema inmunológico como los macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células naturales asesinas e inducen a la fagocitosis o citotoxicidad de los patógenos), dirigen a los virus del dengue hacia las células blanco, originando una infección potenciada.

Daño celular: por acción directa del virus, induce apoptosis, necrosis y que puede afectar células como el hepatocito, células endoteliales y las neuronas. En el endotelio en especial, el daño si es que puede observarse, no es proporcional con la salida de líquido a un tercer espacio.(18)

- **Acción de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus del dengue.**

Da como resultado una reacción cruzada contra proteínas de la coagulación como el fibrinógeno y proteínas de las células endoteliales. Hay también activación del complemento con liberación de anafilotoxinas y aumento de la permeabilidad vascular. (18)

- **Lisis celular.**

Por la activación de linfocitos T citotóxicos. (18)

- **Acción de citosinas.**

Las citocinas como el factor de necrosis tumoral, interferón gamma e interleucina I, liberadas por monocitos y linfocitos T provocan alteración en la permeabilidad vascular que desemboca en extravasación de líquido,

generando hipovolemia, estado de shock y edema pulmonar no cardiogénico.(18)

- **Proliferación policlonal de las células B.**

Es inducida por la infección del virus del dengue y conduce a una producción de IgM. Se ha detectado que existe una reacción cruzada entre los antígenos virales y moléculas plaquetarias, estos anticuerpos producen lisis e inhibición en la agregación de estas.

La inducción de la lisis plaquetaria explica, al menos en parte, la trombocitopenia de la fase aguda que es principalmente causada por la activación del complemento. En resumen, es probable que exista una reacción anormal de la inmunidad, lo que produce una respuesta alterada de los anticuerpos ante los elevados niveles de viremia y antígenos circulantes y con ello la exacerbación de la producción de citocinas, activación de linfocitos T y alteración en la eliminación de cuerpos apoptóticos.(18)

#### **1.1.4 Estructura del virus del dengue**

##### **1.1.4.1 Proteínas estructurales**

###### **1.1.4.1.1 Proteína C**

Proteína de la cápside o proteína Core, está conformada por cuatro hélices alfa, las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas permitiendo anclar la proteína de membrana al retículo endoplásmico.

La hélice 1 se encuentra orientada al citoplasma, es de carácter básico y se asocia al ARN genómico. Protege al ARN viral de la degradación.

La hélice 2 es hidrofóbica e interviene en el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. Interactúa con las proteínas

precursoras de membrana y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales.(19)

#### **1.1.4.1.2 Proteína precursora de membrana**

Está presente en los viriones inmaduros, participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. (19)

#### **1.1.4.1.3 Proteína de membrana**

Tiene dos dominios transmembrana y un ectodominio el cual induce la apoptosis.(19)

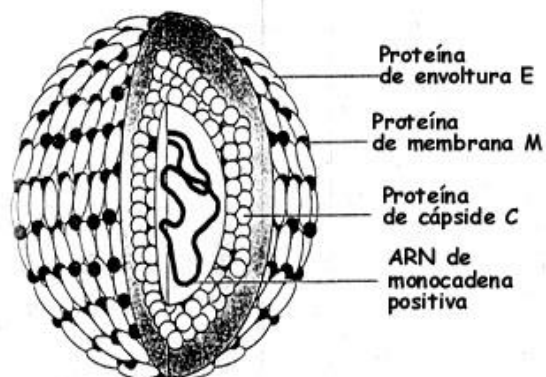
#### **1.1.4.1.4 Proteína de envoltura E**

Posee tres dominios denominados I, II y III. Los dominios II y III son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables.

Es el principal inmunógeno del virus, estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores.

Su importancia funcional radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables, favoreciendo la endocitosis del virus. (19)

**4 Proteína de envoltura E**



## **1.1.4.2 Proteínas no estructurales**

### **1.1.4.2.1 Proteína NS1**

Está asociada a las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Se encuentra soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular, estimulando el sistema inmunitario.(19)

### **1.1.4.2.2 Proteína NS2A**

Promueve el ensamblaje y la replicación viral. (19)

### **1.1.4.2.3 Proteína NS2B**

Posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico. (19)

### **1.1.4.2.4 La proteína NS3**

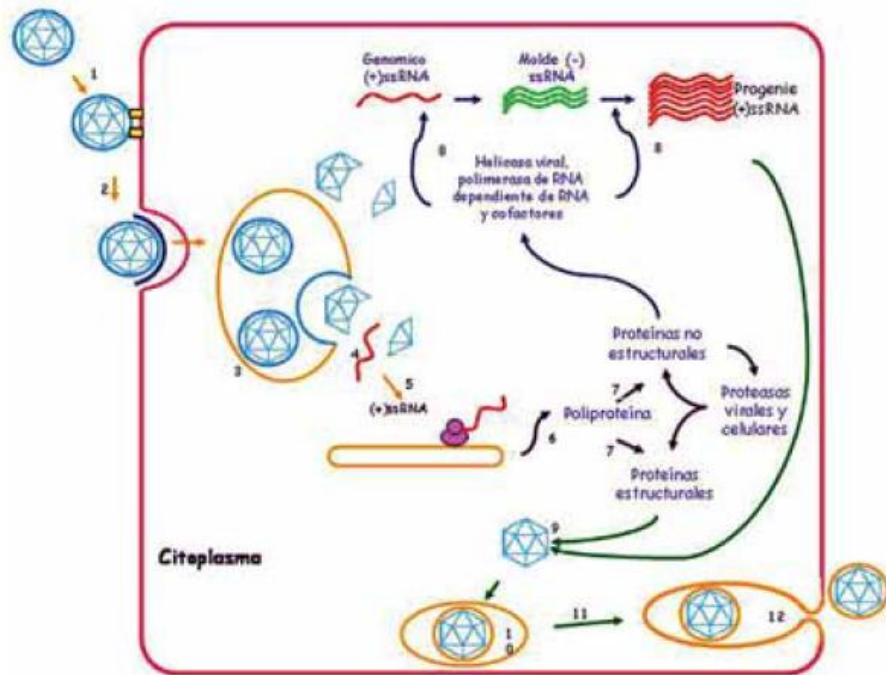
Posee un extremo N-terminal con una función proteolítica y un extremo C-terminal con diferentes actividades enzimáticas; ambas funciones son indispensables en la replicación viral.(19)

## **1.1.5 Entrada del ciclo intracelular**

La entrada del virus en células de los mamíferos y en las de mosquito, inicia con el acercamiento del virus del dengue a la superficie de la célula; la proteína E interactúa con proteínas de la membrana celular que median la unión y la endocitosis del virus. El dominio III de la proteína E interactúa con el receptor laminina LAMR1, la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intercelular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209) y con proteoglicanos como el heparán sulfato, entre otras moléculas.(20)



## 5 Entrada del Ciclo Celular



El endosoma producida por la endocitosis del virus se fragmenta introduciendo la nucleocápside al citoplasma, liberando el ARN viral. El genoma es traducido a una poliproteína sencilla, la cual sufre modificaciones(21)por los componentes celulares del hospedero y las proteasas virales. Se producen las proteínas necesarias para la replicación viral y empaquetamiento. La replicación viral se lleva a cabo en las membranas intracelulares y se unen al retículo endoplásmico. Nuevamente se vuelven a unir las partículas virales y son transportadas al aparato de Golgi. Por último, las partículas maduras del virus son liberadas por exocitosis. (22)

### **3.2 Chikungunya**

Chikungunya es una enfermedad febril viral, transmitida por picadura de mosquitos del género *Aedes*. La palabra Chikungunya, proviene del makonde, un lenguaje hablado en el sur de Tanzania y significa "hombre encorvado o retorcido", otros lo traducen "el que se inclina hacia arriba", por la posición antálgica de los pacientes debido al dolor en las articulaciones. (23)(24)

El virus del Chikungunya es conocido como un virus artritogénico, pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae*. Es un virus con un genoma ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 11,5 kb de longitud que codifica para cinco proteínas estructurales que componen la partícula viral madura. También codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1e4) implicadas en la replicación viral. Se han identificado tres linajes del virus del Chikungunya: ECSA (Este, Central y Sur África), África occidental y Asiático. La anterior subdivisión está basada en las secuencias de genes de la proteína E1 de la envoltura (E1gp).(23)(25)

#### **3.2.1 Historia**

El virus fue descrito por primera vez en 1952 en Tanzania, por W.H.R. Lumsden. Originariamente su transmisión era solo zoonótica, con brotes epidémicos aislados en humanos, pero a partir del año 2000 la infección se ha extendido a millones de personas. Los casos diagnosticados en las Américas son del genotipo asiático. El virus puede mantenerse en tejidos de articulaciones y causar artralgias prolongadas, asociadas a una respuesta inmune persistente. (6)

2000: se identificaron los brotes en África, Asia y el subcontinente indio.

2005: Se reportaron múltiples brotes en toda África, Océano Indico.

2006: El brote se extendió a los continentes cercanos del océano Índico.

2013: En la India se reporta un gran brote y también se vio afectados diferentes países.

### 3.2.2 Epidemiología

En Guatemala se han reportado hasta el 28 de octubre de este mismo año, 356 casos de Chikungunya, El grupo de edad afectado esta entre los 20 a 59 años. Seis áreas de salud presentaron la incidencia más alta son: Santa Rosa, Petén sur Oriental, Guatemala Nor Occidente, Chiquimula, Quetzaltenango y Jutiapa. Las áreas en riesgo para ambos periodos analizados son: Santa Rosa, Chiquimula y Peten sur Oriente. (26)

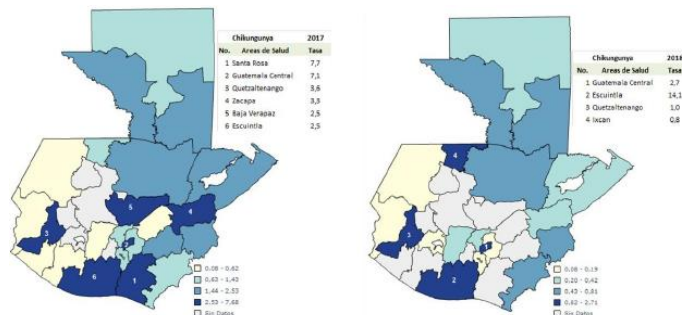
Los casos acumulados de Chikungunya de la semana epidemiológica de la 1 a la 26 del período 2018, representan un descenso de 70% (81/273) respecto al 2017, nueve áreas de salud superan la tasa de país de 0.48 por cada 100,000 habitantes.

#### Chikungunya, tasa de incidencia acumulada por área de salud, hasta la semana epidemiológica 26 Guatemala, 2017 - 2018

Las tasas de incidencia de Chikungunya por 100,000 habitantes y estratificadas por cuartiles en el período que comprende de la semana epidemiológica de 1 a la 26 del año 2017, evidencia que las áreas de salud con mayor riesgo para este evento son: Santa Rosa, Guatemala Central, Quetzaltenango, Zacapa, Baja Verapaz y Escuintla con un rango de tasas 2.5 a 7.7.

6 Tasa de incidencia Acumulada por área de salud Chikungunya

Fuente: SIGSA



En el periodo 2018, se encuentran dentro del cuartil de mayor riesgo cuatro áreas de salud siendo: Guatemala Central, Escuintla, Quetzaltenango e Ixcán, con rangos de tasa de 0.8 a 2.7 por 100,000 habitantes.

## **Patogenia**

### **3.2.2.1 Manifestaciones clínicas**

#### **3.2.2.1.1 Enfermedad Aguda**

Después de un período de incubación de 3-7 días, tras la picadura del mosquito el de CHIKV causa una enfermedad febril generalmente asociado con artralgia/artritis (87%), dolor de espalda (67%) y cefalea (62%).

La viremia persiste hasta 8 días desde el inicio del cuadro clínico. Los tobillos, las muñecas y las articulaciones pequeñas de la mano tienden a verse más afectados. Entre las articulaciones más grandes también se incluyen rodilla, escapula y columna vertebral. Poliartritis `migratoria` con edema fueron vistos en alrededor de 70% de los casos. (27)

En la mayor parte de los pacientes, los síntomas desaparecen en 1 a 3 semanas. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar recaída de los síntomas reumatológicos (por ejemplo, poliartralgia, poliartritis, tendosinovitis) meses después de la enfermedad aguda. Proporciones variables de pacientes notifican dolores persistentes de las articulaciones por meses a años. Las secuelas neurológicas, emocionales y dermatológicas también se describen.

Los individuos mayores y aquellos con trastornos articulares subyacentes reumáticos y traumáticos parecen ser más vulnerables para presentar los síntomas crónicos articulares. La mortalidad es rara y ocurre principalmente en los adultos mayores.(27)

### **3.2.2.1.2 Manifestaciones atípicas**

Aunque la mayoría de las infecciones por CHIKV se manifiestan con fiebre y artralgias, también pueden ocurrir manifestaciones atípicas. Estas manifestaciones pueden deberse a efectos directos del virus, la respuesta inmunológica frente al virus, o la toxicidad de los medicamentos.

Las manifestaciones atípicas son más comunes en ciertos grupos, como la meningoencefalitis y la dermatosis vesiculobulosa se observan con más frecuencia en niños y lactantes.(28)

### **3.2.2.1.3 Manifestaciones subaguda y crónica**

Después de los primeros 10 días, la mayoría de los pacientes sentirá una mejoría en su estado general de salud y del dolor articular. Sin embargo, posteriormente puede ocurrir la reaparición de los síntomas. Algunos pacientes pueden presentar síntomas reumáticos como poliartritis distal, exacerbación del dolor en articulaciones y huesos previamente lesionados, y tenosinovitis hipertrófica subaguda en muñecas y tobillos. También pueden desarrollar trastornos vasculares periféricos transitorios, tales como el síndrome de Raynaud.

La enfermedad crónica se caracteriza por la persistencia de síntomas por más de tres meses. El síntoma persistente más frecuente es la artralgia inflamatoria en las mismas articulaciones que se vieron afectadas durante la etapa aguda. Algunos pacientes desarrollan artritis destructiva, semejante a la artritis reumatoide. Otros síntomas o molestias durante la fase crónica pueden incluir fatiga y depresión, los factores de riesgo para la persistencia de los síntomas son la edad avanzada, los trastornos articulares preexistentes y enfermedad aguda severa. (28)

#### **3.2.2.1.4 Manifestaciones en el recién nacido**

A partir del tercer día de nacido y hasta el séptimo día, con una media de 4 días, puede iniciar uno o más de los siguientes signos y síntomas: fiebre, inapetencia, dolor, edema distal, diversas manifestaciones de la piel (erupción maculopapular, vesículas o bulas), crisis convulsivas, meningoencefalitis y anomalías ecocardiográficas.(29)

### **3.2.3 Estructura del virus Chikungunya**

#### **3.2.3.1 Proteínas Estructurales**

##### **3.2.3.1.1 Glicoproteínas transmembranales tipo I, E2 y E1**

Forman proyecciones y media el reconocimiento del receptor para el virus en la célula diana.

##### **3.2.3.1.2 Cápside viral**

Ubicada en la región central, de simetría icosaédrica y formada por alrededor de 240 copias de la proteína C, encierra una molécula de ARN de una sola hebra de polaridad positiva de aproximadamente 11800 pares de base de longitud, la cual constituye el genoma viral y posee una estructura de metilguanilina en posición 5' y una cola de poli-A en su extremo 3'.(30)

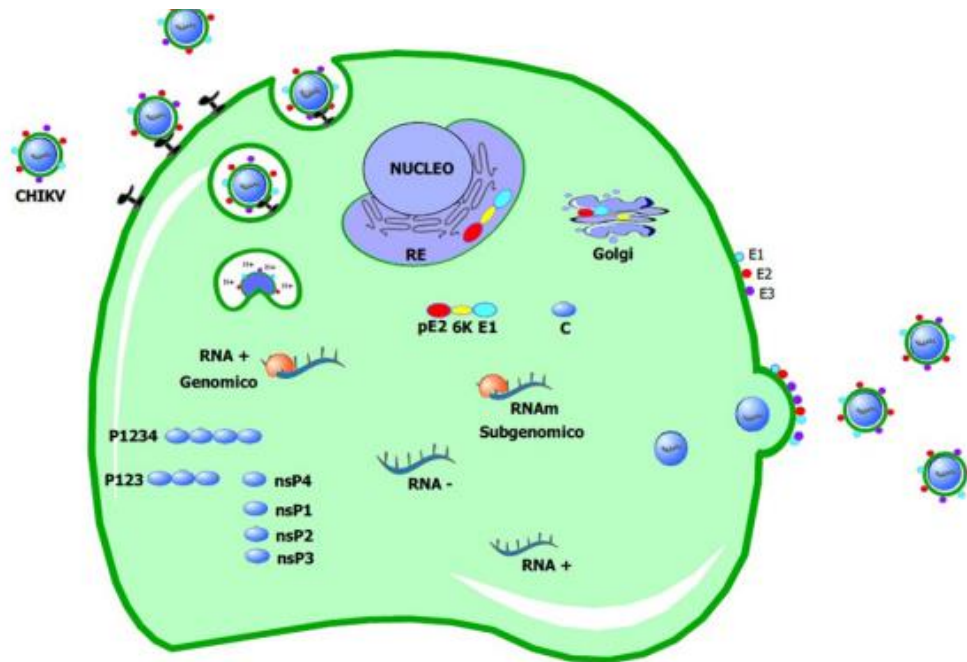
#### **3.2.3.2 Entrada del Ciclo Intracelular**

El mosquito adquiere el virus al tomar sangre de un hospedero infectado por el virus. El virus infecta y se reproduce en las células epiteliales del mesenterón, intestino medio del mosquito. Los virus de la progenie son liberados a través de la membrana basal, para alcanzar la hemolinfa del insecto.

Por esta vía se disemina e infecta a otros tejidos, entre ellos las glándulas salivales. Aquí el virus establece una infección persistente, alcanzando altos títulos en la saliva.

Cuando el mosquito pica nuevamente secreta saliva, la cual contiene elementos anticoagulantes que evitan el taponamiento de la probóscide, y transmite el virus al nuevo hospedero.(31)

### 7 Modelo de la multiplicación de los alphavirus y su expresión génica



En el hospedero el virus entra en la célula diana, monocito/macrofago, mediante mecanismos de endocitosis mediada por receptores y se multiplica en el citoplasma celular. Luego de la acidificación de la vesícula y la correspondiente decapsidación, el genoma viral consiste en un ARNm, es traducido en una proteína, llamada P1234. (31)

Esta poliproteína es escindida por la proteasa viral nsP2 en las cuatro proteínas no estructurales, necesarias para la transcripción y la replicación del ARN viral. Estas cuatro proteínas realizan actividad de ARN-polimerasa para la síntesis de ARN viral; colocación del capuchón en el extremo 5' del ARNm viral y en el ARNm subgenómico que da origen a las proteínas estructurales; actividad helicasa, implicada en el desenrollamiento de la molécula de ARN durante la replicación genómica y actividad de proteasa para el procesamiento de la poliproteína P1234.(31)

La expresión de las cuatro proteínas no estructurales a partir de proteólisis de la P1234 procede mediante mecanismos que están implicados en la regulación de la replicación del ARN viral. Mediante un proceso de autoproteólisis, la poliproteína precursora origina la proteína intermediaria P123 y la proteína madura nsP4, capaces de realizar la síntesis de ARN de polaridad negativa (ARN-) viral pero que no son muy eficientes en la síntesis de ARN de polaridad positiva (ARN+). Una nueva proteólisis de P123 entre los polipéptidos nsP1 y nsP2 da lugar a una actividad polimerasa que es capaz de sintetizar, en forma eficiente, tanto ARN- como ARN+. Una segunda proteólisis entre nsP2 y nsP3 origina una polimerasa capaz de sintetizar ARN+. Se ha propuesto que la regulación de la replicación del ARN procede mediante una proteólisis diferencial de P123. En las etapas precoces de la infección, nsP4 y P123 forman complejos de replicación de ARN- transitorios que desaparecen con la proteólisis de P123. (31)

En las etapas tardías de la infección, un nivel elevado de actividad de proteinasa viral elimina la síntesis de novo de P123 y ninguna síntesis adicional de ARN- es posible. En contraste, nsP4 y los productos de la proteólisis de P123 forman complejos de replicación de ARN+ que son estables y permanecen activos a lo largo del ciclo de infección. (31)



Las proteínas de estructura, consistentes en la proteína de la cápside, C, las glicoproteínas de envoltura, E3, E2 y E1 y la proteína 6K son traducidas como una poliproteína a partir de un ARNm subgenómico, sintetizado en las etapas tardías del ciclo de multiplicación que preceden al ensamblaje viral. El ARNm subgenómico es sintetizado por la polimerasa viral, utilizando como molde una molécula de ARN antígenómico. Una vez sintetizada la poliproteína precursora, la proteína C es liberada de esta mediante una actividad autocatalítica.

La poliproteína remanente, consistente en una glicoproteína, es insertada mediante secuencias señales en el retículo endoplásmico, donde es escindida por enzimas celulares allí localizadas para originar la proteína precursora de E2, la glicoproteína PE2, la pequeña proteína 6K y la glicoproteína E1. Las glicoproteínas PE2 y E1 permanecen unidas formando un heterodímero, que es transportado hacia la membrana plasmática.(31)

La maduración de PE2 es realizada durante su transporte a la membrana plasmática por parte de la enzima celular furina, lo cual origina la pequeña glicoproteína E3 y la glicoproteína de envoltura E2. El proceso de proteólisis por parte de la furina celular es imprescindible para la obtención de virus maduros infecciosos. (31)

### **3.3 Zika**

El virus Zika pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, el mismo al que pertenecen el virus del dengue, la fiebre amarilla o la encefalitis japonesa, la enfermedad por virus Zika presenta una sintomatología por lo general leve que puede pasar desapercibida o diagnosticarse erróneamente como dengue,

chikungunya u otras patologías virales que cursen con fiebre y exantema. Los síntomas principales son:

- Elevación de la temperatura corporal por encima de 37,2°C.
- Exantema maculo-papular que se extiende frecuentemente desde la cara al resto del cuerpo.
- Artritis o artralgia pasajera con inflamación de articulaciones (principalmente en las articulaciones pequeñas de manos y pies).
- Hiperemia conjuntival o conjuntivitis bilateral.
- Síntomas inespecíficos como mialgia, cansancio y dolor de cabeza.

El periodo de incubación oscila entre 3 y 12 días y la duración de la sintomatología entre 2 y 7 días. Las infecciones asintomáticas son frecuentes y se estima que tan solo 1 de cada 4 infectados desarrolla clínica. (32)(33)

La transmisión del virus se produce a través de la picadura del mosquito vector. En humanos el virus se ha detectado en sangre, saliva, orina, semen y leche materna por lo que se ha planteado la hipótesis de la posible transmisión a través de transfusiones sanguíneas, contactos sexuales o a través de leche materna. En todo caso, no se conoce el papel que pueden jugar estos posibles modos de transmisión en la extensión de la enfermedad.(34)(32)

### 3.3.1 Historia

El descubrimiento del Virus del Zika fue el resultado de programas de investigación para la fiebre amarilla patrocinado por la fundación Rockefeller en 1914 a 1970. Hay considerables datos de la seroprevalencia del ZIKV en África, pero siendo esta región una con los números más altos en cuanto a Flavivirus, siempre se representan reacciones cruzadas entre los virus, haciéndolo difícil de interpretar. (35)

- 1947: El virus del Zika fue aislado por primera vez.
- 2007: El primer brote de Zika fue reportado en las islas Yap de Micronesia.
- 2013: Epidemia en las Polinesias francesas en el sur del pacífico.
- 2014: Brotes pequeños en Nueva Caledonia, las Islas Cook y las Islas de Pascua.
- 2014: El virus del Zika hizo su primera aparición en las Américas, Brasil.
- 2015: Durante la semana epidemiológica 47, las autoridades de Salud de Guatemala reportaron la detección del primer caso confirmado del virus del Zika en el departamento de Zacapa.
- 2016: Se reportaron casos de Zika en los territorios de Suramérica, Centroamérica, Norteamérica y el Caribe; también en ese mismo año, se reportaron brotes en el este de África. (36)

### 3.3.2 Epidemiología

En la semana epidemiológica 47 del año 2015, las autoridades sanitarias de Guatemala informaron la detección del primer caso confirmado de Zika, transmitida por vectores autóctonos en Guatemala, en el Zacapa Departamento.

Los casos acumulados de Zika de la semana epidemiológica 1 a la 20 del período 2018, presentan decremento de 75% (268/66). No hay casos notificados en diez áreas de salud. De los casos acumulados en Guatemala central se observa 66% de decremento. Durante la semana epidemiológica 20 ningún área de salud notifico casos, el decremento es de 100%.

#### 8 Casos y Tasas Acumulados por habitantes Zika

Casos y Tasas Acumulados por 100000 habitantes.  
GUATEMALA 2017 - 2018 S.E. 20

Área de Salud	Casos de la semana 20		2017		2018	
	2017	2018	Casos	Tasas	Casos	Tasas
Guatemala Central	6	0	127	12,77	43	4,32
Zacapa	0	0	1	0,41	2	0,82
Quetzaltenango	0	0	14	1,55	7	0,78
Suchitepéquez	0	0	0	0	4	0,67
Guatemala Sur	0	0	8	0,74	6	0,56
Santa Rosa	0	0	20	5,12	1	0,26
Jutiapa	3	0	10	2,03	1	0,20
Escuintla	2	0	23	2,91	1	0,13
Alta Verapaz	0	0	2	0,15	1	0,08
Guatemala Nor Occidente	0	0	3	0,36	0	0
Huehuetenango	0	0	1	0,08	0	0
El Quiché	0	0	11	1,30	0	0
Retalhuleu	0	0	1	0,29	0	0
Izabal	0	0	4	0,84	0	0
Chiquimula	0	0	35	8,22	0	0
Baja Verapaz	0	0	2	0,63	0	0
Petén Norte	1	0	2	0,82	0	0
Petén Sur Oriental	0	0	2	0,81	0	0
Petén Sur Occidental	0	0	2	0,88	0	0
<b>Total país.</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>268</b>	<b>1,58</b>	<b>66</b>	<b>0,39</b>

Fuente: SIGSA/Cálculo D.E.

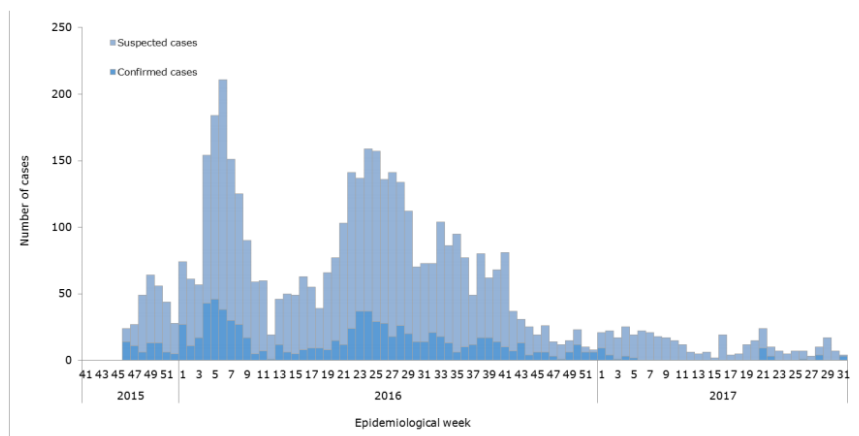
### 3.3.2.1 Distribución Geográfica

En el año 2017, a partir de la semana 28, Guatemala informó casos sospechosos de Zika en 20 áreas de salud. Las tasas de incidencia más altas se registraron en Guatemala central (14 casos por 100,000 habitantes), Chiquimula (6 casos por 100,000) y Santa Rosa (5 casos por 100,000). En 2016, las tasas de incidencia más altas se registraron en las áreas de salud de Santa Rosa (106 casos por 100,000), Zacapa (106 casos por 100,000) y Chiquimula (61 casos por 100,000).

### 3.3.2.2 Tendencia

Desde finales del 2015 hasta la semana epidemiológica 6 del 2016, se observó una tendencia creciente de casos de Zika en Guatemala. Desde entonces, se ha observado una reducción del número de casos semanales, con un ligero aumento en las primeras semanas del 2017. En las últimas 8 semanas informadas (semana epidemiológica 24al 31 del 2017), un promedio de 7 casos sospechosos de Zika por semana reportados.

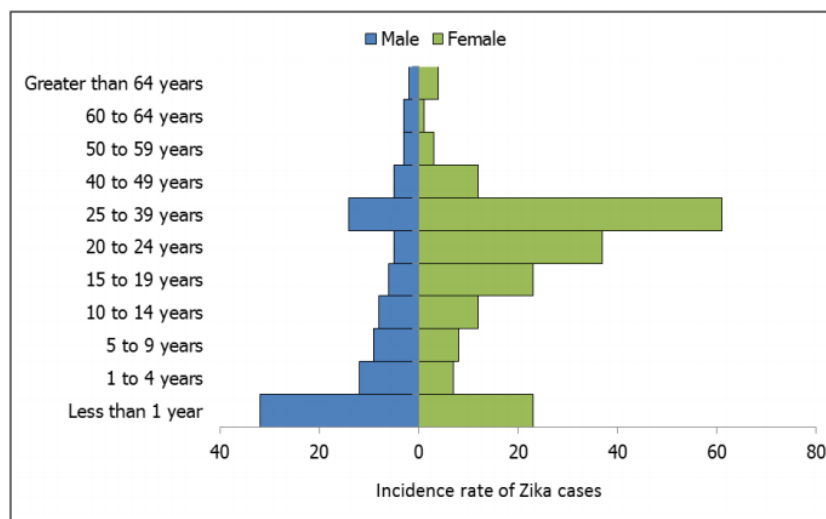
**9 Casos de Zika sospechosos y confirmados por semana epidemiológica en Guatemala. Semana Epidemiológica 41 del 2015 a Semana Epidemiológica 31 del 2017**



**Fuente:** Datos reportados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala

Con respecto a la distribución de casos por edad y sexo, según los datos disponibles, en el 2017 la mayor tasa de incidencia de Zika se observó en mujeres de 15 a 39 años, seguidas por mujeres de 20 a 24 años probablemente debido a un sesgo en la detección de mujeres embarazadas infectadas con Zika. En la mayoría de los grupos de edad, la tasa de incidencia observada en las mujeres fue más alta que la de los hombres, con la excepción de los menores de 1 año, de 5 a 9 años y los de 60 a 64 años.

**10 Tasa de incidencia de casos de Zika por 100,000 habitantes por edad y sexo en Guatemala. Semana Epidemiológica 1 a Semana Epidemiológica 28 de 2017**



**Fuente:** Datos reportados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala y reproducidos por la OPS / OMS.

### 3.3.3 Patogenia

#### 3.3.3.1 Manifestaciones clínicas

##### 3.3.3.1.1 Formas Sintomáticas

Cuadros autolimitados que tienen una duración promedio de 4 a 7 días y se caracterizan por presentar síntomas como fiebre, conjuntivitis no

purulenta, cefalea, mialgia, artralgia, astenia, exantema maculopapular que inicia en la región cefálica, edema en miembros inferiores y con menor frecuencia, dolor retro ocular, anorexia, vómitos, diarrea o dolor abdominal.

También puede presentarse anomalías congénitas en recién nacidos cuyas madres estuvieron en contacto con el virus del Zika durante la gestación, principalmente durante el primer o segundo trimestre de gestación.

Estas malformaciones incluyen microcefalia, anomalías cerebrales, síndromes polimalformativos que incluyen lesiones cerebrales, disfunción del tronco cerebral y ausencia del reflejo de deglución. Sus potenciales complicaciones de tipo autoinmune a nivel neurológico y hematológico como el síndrome de Guillain-Barré. (37)

#### **3.3.3.1.2 Síndrome Guillain-Barré**

Es una polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda de origen desconocido. Su fisiopatología no está completamente aclarada y se señala que un organismo infeccioso induce una respuesta inmunológica, de origen tanto humoral como celular, la que produce una reacción cruzada contra la vaina de mielina de los nervios periféricos que causa su destrucción.(37)

#### **3.3.3.1.3 Complicaciones del Zika en embarazadas**

Las mujeres embarazadas no difieren de otros grupos poblacionales en cuanto a la frecuencia de las complicaciones, pero al ser una virosis con alta afinidad por tejido nervioso, las afectaciones en el sistema nervioso central y periférico, tanto de la madre como su(s) feto(s) pueden verse comprometidos en grado muy variable, que dependerán de la virulencia, de la carga viral, de la susceptibilidad de la mujer y de su respuesta inmunológica personal.

Dentro de las complicaciones encontramos las siguientes:

- Complicaciones neurológicas: encefalitis, parestesias, meningoencefalitis, parálisis facial y mielitis.
- Complicaciones autoinmunes: síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica.
- Complicaciones fetales: microcefalia, microftalmia, calcificaciones intraoculares, intracraneales e intrahepáticas, patología de fosa craneal posterior, muerte embrionaria o fetal y abortos.(37)

### **3.3.4 Estructura del virus del Zika**

#### **3.3.4.1 Proteínas estructurales**

##### **3.3.4.1.1 Proteínas E y M**

Proteínas contenidas en la membrana del huésped, origina bicapa lipídica que envuelve al nucleocápside. La proteína E compone la mayor parte de la superficie del virión, participa en la replicación, la unión y fusión de la membrana del huésped.

##### **3.3.4.1.2 Proteínas E y M**

Une al ARN para formar la nucleocápside, asistencia durante la estabilización, conformación-folding y secreción de la proteína E.

#### **3.3.4.2 Proteínas no estructurales**

##### **3.3.4.2.1 Proteína NS1**

Se localiza en la superficie celular y es secretada extracelularmente, modula la señalización del sistema inmune innato, los Anti-NS1 median



trombocitopenia, provoca daño endotelial, antagoniza C4, induce apoptosis.

#### **3.3.4.2.2 Proteína NS2A**

Proteína encargada de la síntesis del ARN y el ensamblaje viral.

#### **3.3.4.2.3 Proteína NS3**

Junto con la proteína NSA2B actúa como una proteasa de serina. Induce a la apoptosis, modula en RNA en la célula afectada bloquea la señal del INF tipo I, estimula la liberación de gránulos de stress de la célula.

#### **3.3.4.2.4 Proteína NS4A**

Participa en la replicación del ARN, inhibe la señal del INF- tipo I, induce la autofagia, inhibe la apoptosis.

#### **3.3.4.2.5 Proteína NS4B**

Inhibe la señal del INF- tipo I.

#### **3.3.4.2.6 Proteína NS5**

Participa en la síntesis de ARN

### **3.3.4.3 Entrada del ciclo celular**

Los datos de la patogénesis del ZIKV son muy escasos. El fibroblasto de la piel, los queratinocitos epidérmicos y las células dendríticas inmaduras son permisibles a la infección. La señal DC, la proteína de membrana AXL, Tyro y el factor de adhesión TIM-1 permiten su entrada. La replicación del virus

activa la respuesta inmune antiviral y la producción del interferón I en las células afectadas.

La formación de auto fagosomas está asociado al aumento de la replicación viral, y en la inducción de la agrupación de expresión antigénica viral (RIG-1, MDA-5 y TLR3) los cuales son detectables en la presencia de la asociación patógeno-patrón molecular que fue observada después en los fibroblastos de la piel. La infección induce a la autofagia programada confirmada por la presencia de características como las endosomas en los fibroblastos infectados. Las células activadas durante la fiebre son (th1, th2, th9 y th17).

### **3.4 Pruebas utilizadas para la detección de Arbovirus**

#### **3.4.1 Pruebas Serológicas**

La prueba rápida para Dengue Ag es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa del antígeno del virus del dengue (Dengue Ag) en suero humano, plasma.

Su función es diagnosticar la infección por virus del dengue. Cualquier muestra positiva confirmada con la prueba rápida debe de ser confirmada con un método alternativo más específico.

La detección del anticuerpo Serológico IgM es el método más común para el diagnóstico del virus del dengue. Últimamente, la detección de antígenos liberados durante la replicación del virus en pacientes infectados muestra resultados prometedores. Permite el diagnóstico desde el primer día o al día siguiente de que comienza la fiebre hasta el 9no día.

La prueba rápida de Dengue Ag es un inmunoensayo cromatográfico de prueba de cassette consiste en:

1. Una almohadilla de conjugado con colorante tinto que contiene ratón anti-dengue NS1 conjugado con oro coloidal de conjugado de dengue Ag.
2. Una tira de membrana de nitrocelulosa que contiene una línea de prueba (Línea C) y una línea de control (línea C). La línea T esta previamente rociada anticuerpo ratón anti-dengue NS1IgG y la línea C esta previamente rociada con anticuerpos de los 4 serotipos del virus del dengue.(38)

### 3.4.2 Pruebas Moleculares PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados(dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),el ion magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone el PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.(39)

Cada uno de los ciclos consta de las tres etapas siguientes:

- **Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra:** Típicamente Calentando la muestra a 93-95°C, durante unos 30 segundos, se consigue la separación de la doble hélice en dos cadenas sencillas por

rotura de los enlaces de hidrógeno y consiguiente des apareamiento de las bases complementarias.

- **Hibridación:** Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases a temperaturas que varían entre 50 y 70°C, dependiendo de la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión) del duplex esperado y durante un tiempo aproximado de unos 20 segundos, cada uno de los primers se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar.
- **Extensión o elongación:** Típicamente a 70-75°C, comienza a funcionar la replicación incorporando nucleótidos sobre los primers y haciendo una copia completa y exacta de la cadena molde. (40)

#### 3.4.2.1 PCR en tiempo real

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción. (39)

La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una PCR (*cuantitativa* PCR), si, por lo contrario, primero obtenemos ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-PCR. (41)

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas.(39)

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. (41)

- **Moléculas o agentes intercalantes**

Tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green. la cual es una molécula cargada positivamente que mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia.(39)

- **Sondas de hibridación específicas**

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET.(41)

1. Sondas de hidrólisis: Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.
  2. Molecular beacons: Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y un aceptor en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana.
  3. Sondas FRET: El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. (41)
- **Señal de fluorescencia**

La señal de fluorescencia se capta de la siguiente manera:

    - a) Excitar al reportero.
    - b) Capturar la señal de emisión de este.
    - c) Realizar el análisis cuantitativo.

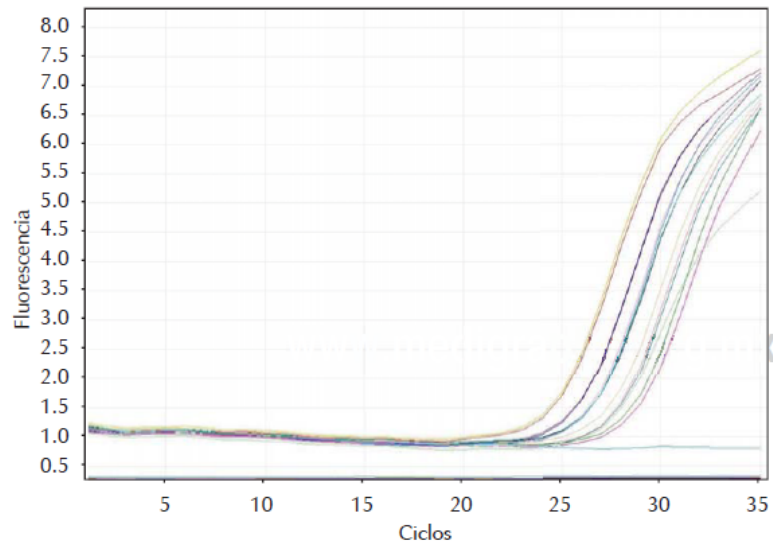
En el mercado existen diferentes tipos de termocicladores para esta finalidad, cuyas diferencias principales son la fuente de energía que utilizan para la excitación. En general son tres las fuentes: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED, por sus siglas en inglés) y láseres. Cualquiera que sea la fuente, primero el reportero es excitado y su señal de emisión colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente que llega hasta un foto detector que captura la información proveniente de la muestra para su análisis en el software del equipo. (39)

- **Cómo se analizan los resultados**

No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada Muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica. Para ello, los termocicladores están proveídos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Una de estas gráficas es la de amplificación que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de Disociación o curva melting que muestra información sobre la especificidad de la reacción. Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este procedimiento depende de los intereses del investigador.(39)

Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración precisa de ácidos nucleídos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. La segunda se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. (41)

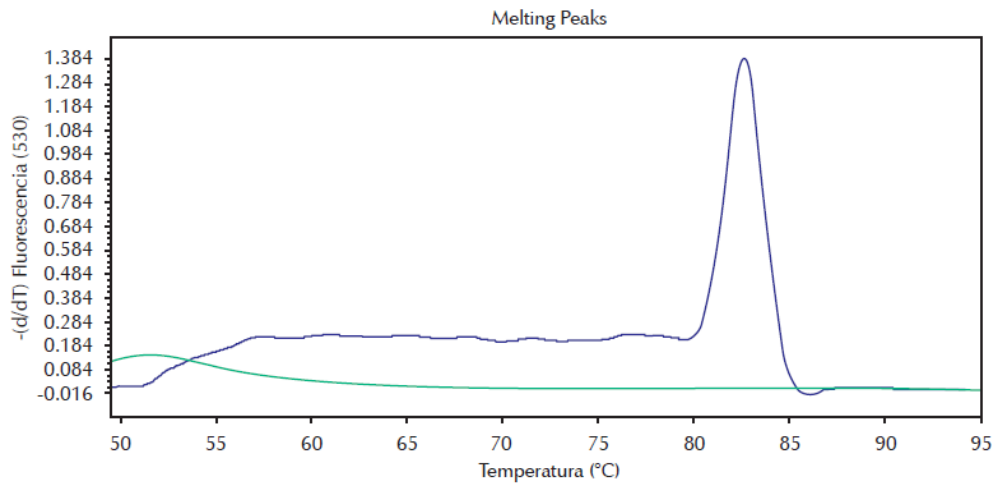
### 11 Curva de amplificación



Curva de amplificación. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN. (39)



## 12 Pico de amplificación



Se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplifico. (39)

### 3.5 Transporte y Almacenamiento de muestras

#### 3.5.1 Almacenamiento de muestras

- Mantener refrigerada (4 °C – 8 °C) si será procesada (o enviada a un laboratorio de referencia) dentro de 48 horas
- Mantener congelada (-10 °C a -20 °C) si será procesada después de las primeras 48 horas o durante un periodo no mayor de 7 días.
- Mantener congelada (-20 a -70 °C) si será procesada después de una semana. La muestra se conserva adecuadamente durante periodos prolongados de tiempo.(42)

### 3.5.2 Transporte de muestras

Se debe garantizar la cadena de frío de las muestras. Enviar (en lo posible) con hielo seco o como mínimo con geles refrigerantes.

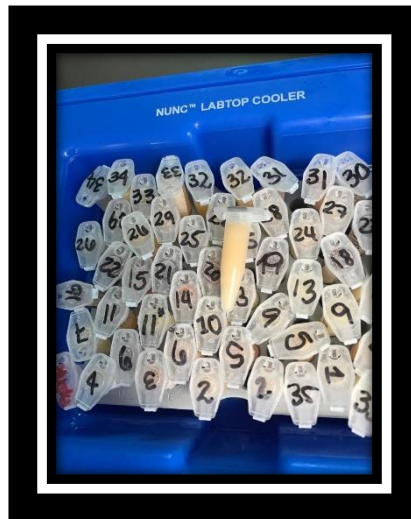
- Enviar durante las primeras 48 horas.
- Las muestras originales deben ser empacadas, marcadas etiquetadas (si se utiliza hielo seco). (42)

### 3.5.3 Sistema de transporte

Las muestras recolectadas se transportaron a la ciudad capital para ser analizadas por método de PCR tiempo real, debido que el Laboratorio los Almendros no cuenta con área de Biología Molecular.

- Transporte primario: plasma congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en Microtubos eppendorf

13 Microtubos eppendorf



- Transporte Secundario: Nunc Labtopcoolers -20°C  
14 Nunc Labtopcoolers



- Transporte Terciario: Hielera eléctrica



15 Hielera eléctrica

La temperatura se mantuvo controlada durante todo el tiempo del transporte a -20°C hasta el momento del análisis.

#### **4. HIPÓTESIS**

Existen casos de infección por Dengue, Zika y Chikungunya en pacientes que asisten al laboratorio clínico los almendros, que no pueden ser detectados en pruebas serológicas debido a la expresión tardía de anticuerpos detectados en pruebas inmunocromatográficas, aumentando la captación de casos positivos cuando se aplican técnicas de biología molecular.

#### **5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **5.1 Objetivo General**

Realizar un tamizaje de pacientes sintomáticos de Dengue, Zika y Chikungunya utilizando técnicas de Biología Molecular e inmunocromatografía.

##### **5.2 Objetivos Específicos**

- 5.2.1 Correlacionar la prueba de inmunocromatografía y PCR en tiempo real para la detección de Dengue.
- 5.2.2 Establecer la cantidad de pacientes portadores de la infección por virus Dengue en pacientes que asisten al Laboratorio Clínico los Almendros.
- 5.2.3 Asociar sintomatología reportada de los pacientes con las características de la infección por Dengue, Zika y Chikungunya.
- 5.2.4 Establecer si existen casos de Chikungunya y Zika entre los pacientes que asisten al Laboratorio Clínico los Almendros en el periodo de abril-octubre 2018.

## 6. METODOLOGÍA

**6.1 Recolección de muestras:** Los pacientes que asistieron al Laboratorio clínico los Almendros durante el periodo de Abril - Octubre del año 2018, se les preguntó sintomatología común con los tres virus de estudio y si anteriormente habían padecido alguna de las enfermedades. Se extraía la muestra al paciente con aguja 22\*1<sup>1/2</sup> se obtenía la muestra en tubos con EDTA 4ml y luego se procedía a realizar la prueba rápida para detección de dengue la cual se utilizó Onsite dengue IgG/IgM. (45)

Los tubos con EDTA se centrifugaban y después con bulbo de 3ml era transferido el plasma a microtubos de 1.5ml estériles, para ser almacenados en un congelador que los mantenía a -20°C.

**6.2 Transporte de muestras:** Debido a que el Laboratorio clínico Los Almendros no cuenta con área de Biología Molecular las muestras se transportaron a la ciudad capital para ser analizadas.

Las muestras se transportaron en un empaque primario el cual era el microtubo de 1.5ml, un empaque secundario el block Nunc labtopcoolers, y el empaque terciario una hielera eléctrica para mantener la cadena de frío de las muestras a una temperatura de -20°C.

**6.3 Análisis de muestras:** Se obtuvo la recolección de las 115 muestras de las cuales 49 fueron analizadas y las otras se descartaron por no cumplir con por lo menos 3 criterios de inclusión o por estar lipémica.

La muestra utilizada fue plasma con EDTA congelado almacenada a -20°C hasta el momento del análisis.

El área de biología molecular cuenta con 4 diferentes áreas:

6.3.1 Área 1: Se realizó la preparación de los reactivos en un campana de flujo laminar AircleanSystems.

6.3.2 Área 2: Preparación de muestras, en esta área se utilizó el kit de extracción High pure viral RNA Kit.(46)

- Paso 1: En un tubo recolector se agregó 200µl de plasma + 400µl de binding buffer + 4µl Poly A + 10µl Control interno.
- Paso 2: Lo anterior, transferir en un tubo con filtro de alta pureza centrifugar en una centrifuga de escritorio Microspin 12 por un minuto a 13.4 rpm.
- Paso 3: Agregar 500µl de inhibidor removal buffer centrifugar por un minuto a 13.4rpm.
- Paso 4: Agregar 450µl wash buffer centrifugar por un minuto a 13.4rpm. (este paso 2 veces)
- Paso 5: Agregar 50µl elution buffer centrifugar por un minuto a 13.4rpm.

6.3.3 Área 3: amplificación de las muestras, se utilizó el kit Fast-track diagnostics.(44)

- Paso 1: realizar el master mix: agregar a un tubo 662.5µl de Buffer + 79.5µl ppmix + 53µl de enzyme. Este master mix es para 53 muestras, tomando en cuenta las 49 muestras para analizar, Control positivo, Control Negativo y 2 de pipeteo de inexactitud. Ver Anexo 36
- Paso 2: pipetear 15µl de master mix en los tubos para rotor + 10µl de la muestra previamente extraída mezclar brevemente pipeteando de arriba a abajo.
- Paso 3: agregar a otro tubo 10µl de control positivo y a otro tubo agregar 10µl de control negativo, los controles deben de estar a temperatura ambiente y agitarlos antes de usar.
- Paso 4:cerrar los tubos con las tapas para rotor
- Paso 5:agitar ligeramente
- Paso 6:colocar las muestras en rotor-Gene 300/600Mic

6.3.4 Área 4: Detección de resultados: se utilizó el software MIC PCR v2.2.0 para rotor-Gene 3000/6000 MIC, no se movió el nivel del umbral.

En todo el procedimiento se utilizó guantes de nitrilo, mascarilla, cofia, puntas de pipetas de volúmenes variables con filtro libres de ADNasa y campanas de flujo laminar. Cada área estaba dividida con el equipo necesario para el análisis.

## **7. Recursos Financieros**

Este estudio se realizó con financiamiento propio.

### CAPÍTULO III

## 8. RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Se realizó el análisis de 49 muestras de pacientes con sintomatología común con los 3 virus de estudio por medio de PCR tiempo real. También se realizó una correlación entre PCR tiempo real para virus dengue y prueba de inmunocromatografía virus dengue para las 49 muestras.

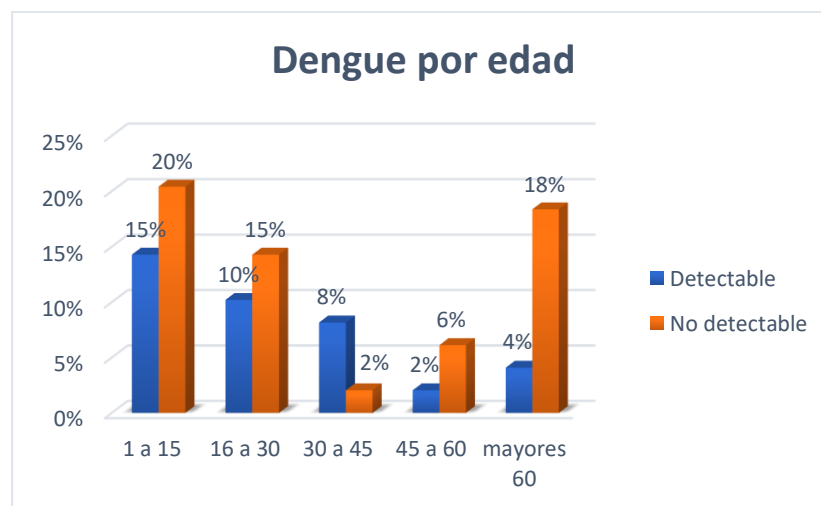
**Tabla 1 Detección de dengue por edad método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics**

Rango de Edad	Detectable	No detectable	Total, general
<b>1 a 15</b>	15%	20%	35%
<b>16 a 30</b>	10%	15%	24%
<b>30 a 45</b>	8%	2%	10%
<b>45 a 60</b>	2%	6%	8%
<b>mayores 60</b>	4%	18%	22%
<b>Total, general</b>	<b>39%</b>	<b>61%</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 1**

**Detección de dengue por edad método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics**



Fuente: Datos Experimentales

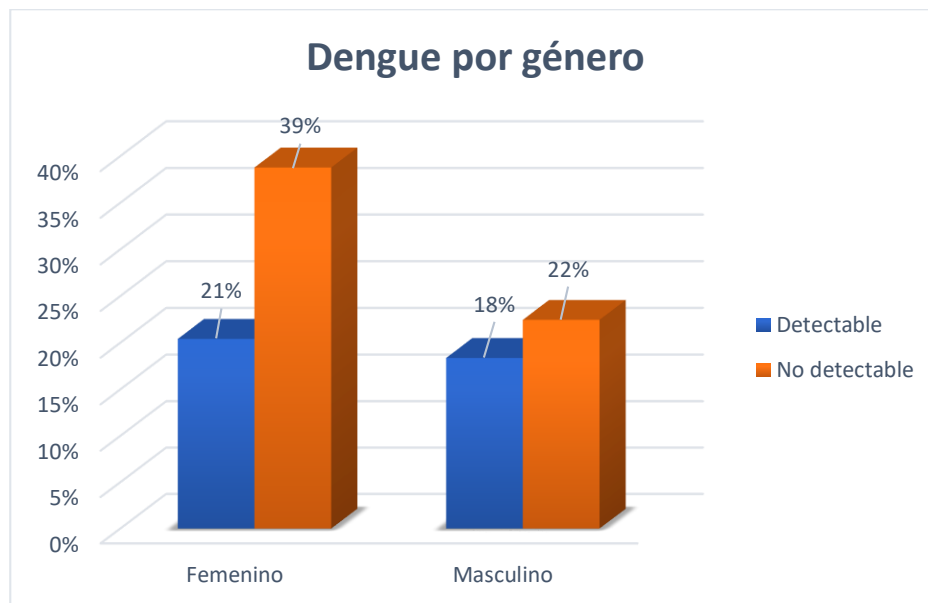


**Tabla 2 Detección de Dengue por género método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics**

<b>Género</b>	<b>Detectable</b>	<b>No detectable</b>	<b>Total general</b>
<b>Femenino</b>	21%	39%	59%
<b>Masculino</b>	18%	22%	41%
<b>Total, general</b>	<b>39%</b>	<b>61%</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 2**  
**Detección de Dengue por género método PCR Tiempo real kit Fast-trackDiagnostics**



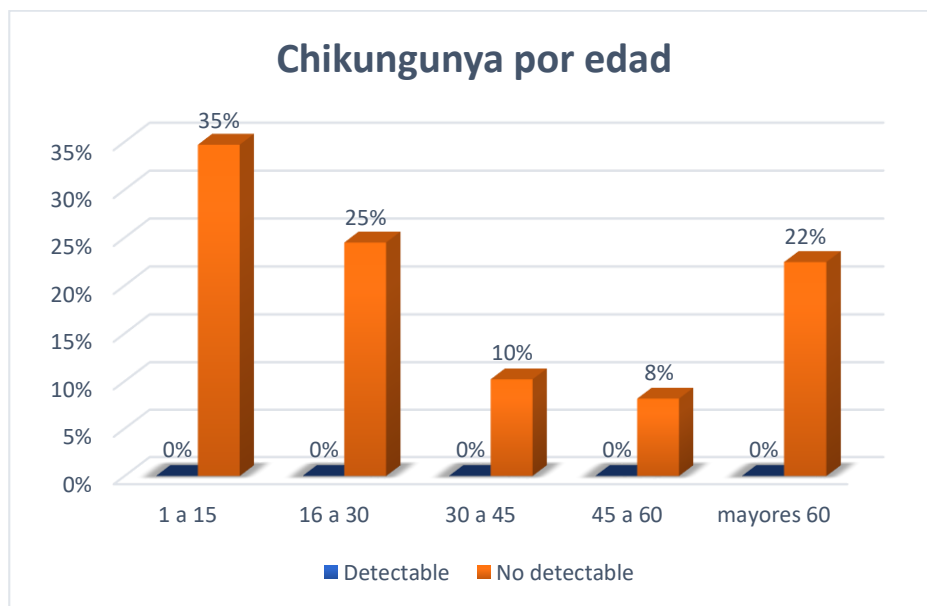
Fuente: Datos Experimentales

**Tabla 3 Detección de Chikungunya por edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**

Rango de edad	No detectable
1 a 15	35%
16 a 30	25%
30 a 45	10%
45 a 60	8%
mayores 60	22%
<b>Total, general</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 3 Detección de Chikungunya por edad, método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**



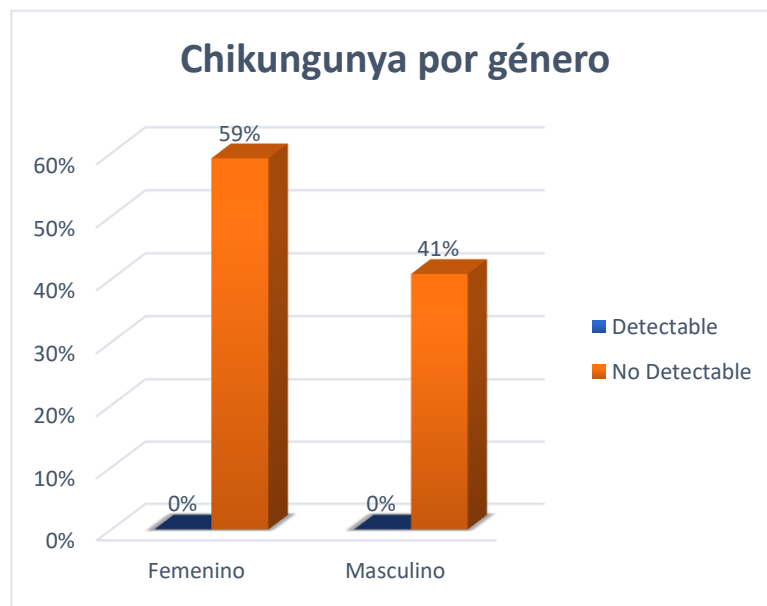
Fuente: Datos Experimentales

**Tabla 4 Detección de Chikungunya por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**

<b>Género</b>	<b>No detectable</b>
<b>Femenino</b>	59%
<b>Masculino</b>	41%
<b>Total general</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 4**  
**Detección de Chikungunya por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**



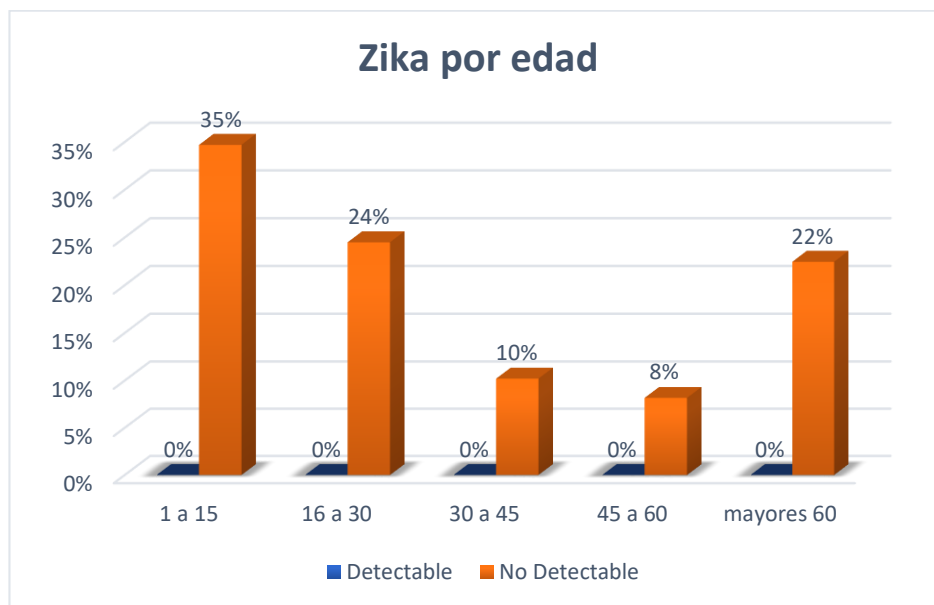
Fuente: Datos Experimentales

**Tabla 5 Detección de Zika por edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**

Rango de Edad	No detectable
1 a 15	35%
16 a 30	24%
30 a 45	10%
45 a 60	8%
mayores 60	22%
<b>Total general</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 5 Detección de Zika por edad método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**



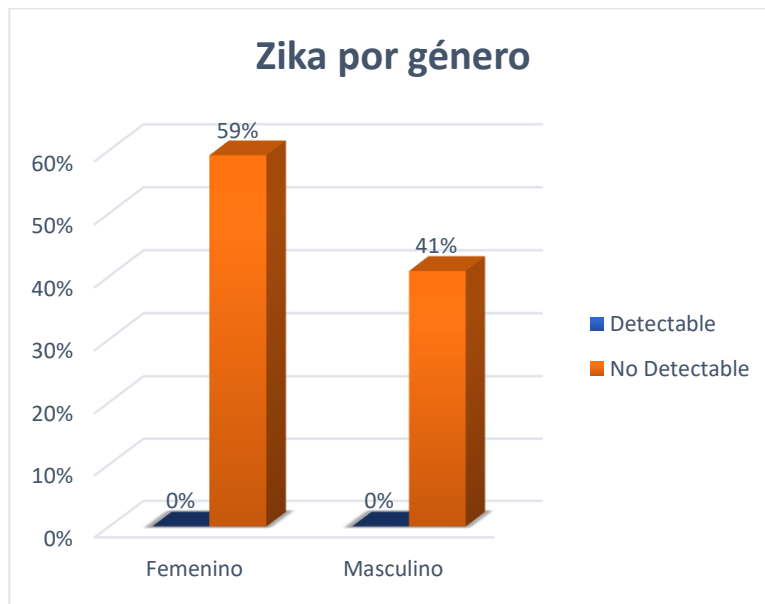
Fuente: Datos Experimentales

**Tabla 6 Detección de Zika por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**

<b>Género</b>	<b>No detectable</b>
<b>Femenino</b>	59%
<b>Masculino</b>	41%
<b>Total general</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 6**  
**Detección de Zika por género método PCR Tiempo real kit Fast-track Diagnostics**



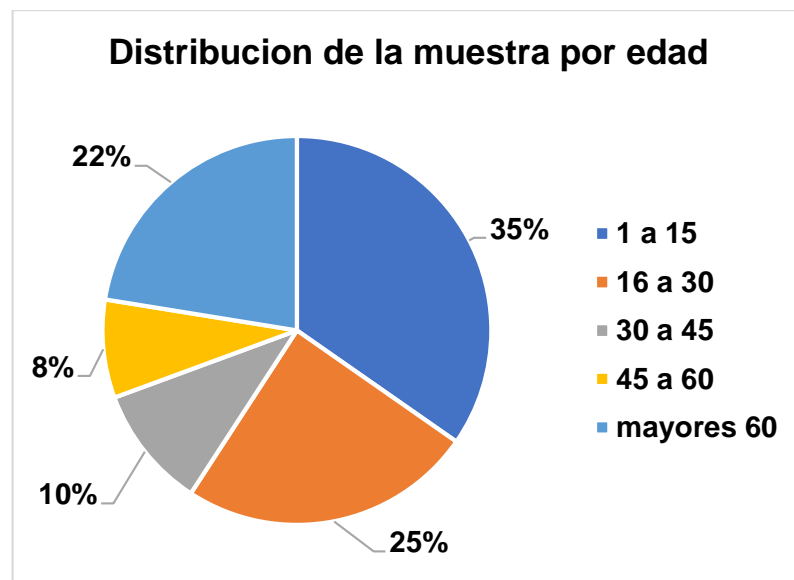
Fuente: Datos Experimentales

**Tabla 7 Distribución de la muestra por edad**

Rango de Edad	Muestra
1 a 15	17
16 a 30	12
30 a 45	5
45 a 60	4
mayores 60	11
<b>Total general</b>	<b>49</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 7**  
**Distribución de la muestra por edad**



Fuente: Datos Experimentales

Se observan la distribución de la muestra por rango de edad, mostrando un mayor porcentaje en el rango de edad 1-15 años.

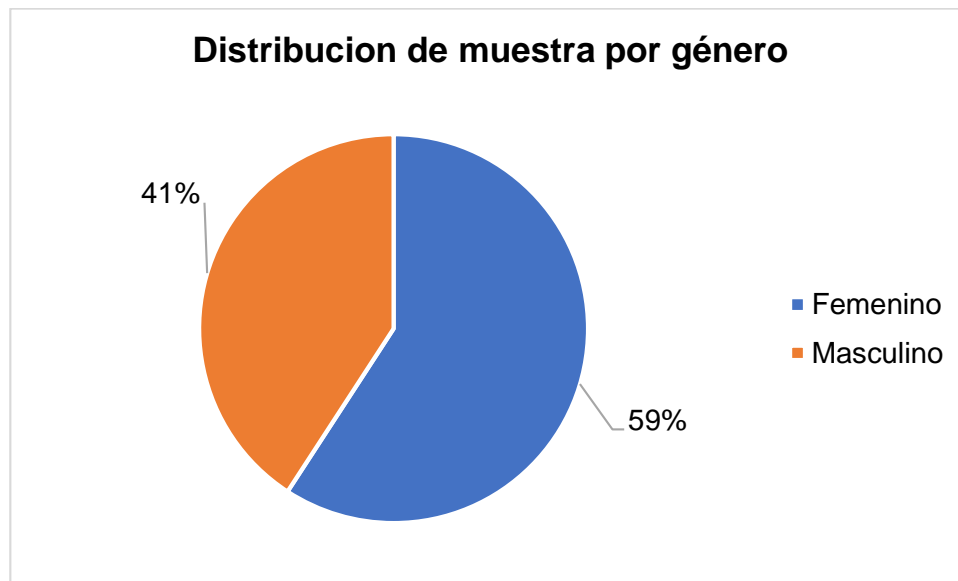
**Tabla 8 Distribución de la muestra por género**

Género	Muestra
Femenino	29
Masculino	20
<b>Total general</b>	<b>49</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 8**  
**Distribución de la muestra por género**

Se observa la distribuida la muestra respecto al género, femenino un 59% y masculino un 41%.



Fuente: Datos Experimentales

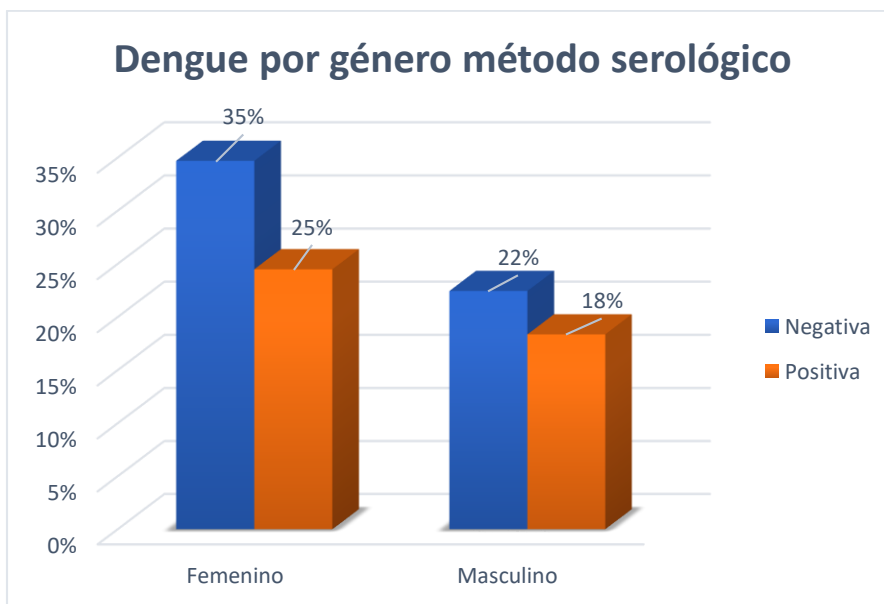
**Tabla 9 Detección de Dengue por género método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue**

<b>Género</b>	<b>Negativa</b>	<b>Positiva</b>	<b>Total general</b>
<b>Femenino</b>	35%	25%	59%
<b>Masculino</b>	22%	18%	41%
<b>Total general</b>	<b>57%</b>	<b>43%</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 9**  
**Detección de Dengue por género método serológico Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue**

Se observan los resultados de las pruebas serológicas inmunocromatográficas para Dengue, mostrando mayor cantidad de pruebas positivas para el género femenino.



Fuente: Datos Experimentales



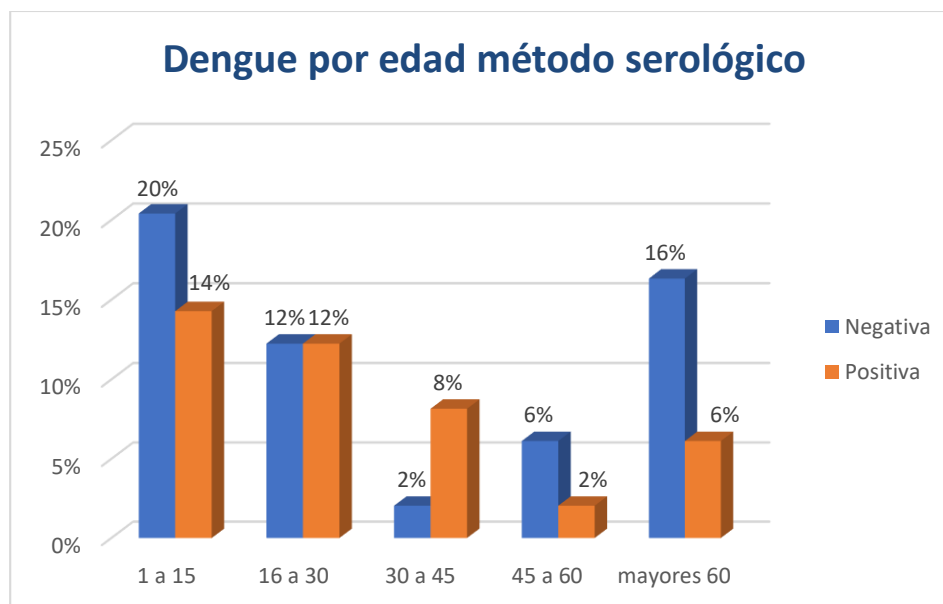
**Tabla 10 Detección de Dengue por edad método serológico  
Inmunocromatográfico marca Biotech CTK Dengue**

Rango de Edad	Negativa	Positiva	Total general
1 a 15	20%	14%	35%
16 a 30	12%	12%	24%
30 a 45	2%	8%	10%
45 a 60	6%	2%	8%
mayores 60	16%	6%	22%
<b>Total general</b>	<b>57%</b>	<b>43%</b>	<b>100%</b>

Fuente: Datos Experimentales

**Gráfica 10  
Detección de Dengue por edad método serológico Inmunocromatográfico  
marca Biotech CTK Dengue**

Se observan los resultados de pruebas serológicas inmunocromatográficas para Dengue por rango de edad, en el cual la mayor cantidad de pruebas positivas están dentro del rango de 1-15 años.



Fuente: Datos Experimentales

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Un diagnóstico definitivo de infección por estos virus se hace en el laboratorio y depende de la detección de antígeno viral o ARN viral o detección anticuerpos específicos en el suero o plasma del paciente. Se debe tomar una muestra sanguínea en la fase aguda, luego del inicio de la enfermedad febril; Una muestra sanguínea en la fase de convalecencia idealmente debe ser tomada de 2-3 semanas después ya que se detectan los anticuerpos producidos después de que se desencadene la reacción antígeno-anticuerpo y se realiza la detección por medio de la técnica de PCR tiempo real.

En la distribución de la muestra se puede observar en la gráfica 7 que el mayor porcentaje por edad es de 1 – 15 años con un 35% y grafica 8 el género femenino tiene el 59%. Esto de las 49 muestras analizadas.

En la técnica de PCR tiempo real se analiza El Ct que es la línea de umbral, es el nivel de detección o punto en el que una reacción alcanza una intensidad fluorescente por encima de los niveles de fondo. También se analiza el Cq el cual es el valor de cuantificación del ciclo, este es el número del ciclo de pcr en el que la curva de reacción de la muestra cruza la línea del umbral (47). En (ver anexo 33) se observan los valores Ct para las 49 muestras analizadas por el método de PCR en tiempo real, de las cuales 19 son detectables para virus Dengue. Los valores de Cq son inversos a la cantidad de ácido nucleico diana que está en la muestra, y se correlacionan con el número de copias diana en la muestra. Bajos valores de Cq (por debajo de 29 ciclos) indican altas cantidades de secuencia diana. Cq con valores más altos (por encima de 38 ciclos) significa cantidades más bajas de su ácido nucleído diana(47) (ver Anexos 5-8). En el análisis de las muestras la traza de amplificación exponencial para el control positivo cae por debajo de un Ct de 33 según kit de amplificación Fast- TrackDiagnostics (ver Anexo 2), y el control interno muestra traza de amplificación positiva exponencial (ver Anexo 4), el control negativo por debajo del umbral (ver Anexo 3). El nivel del umbral se estableció por

el Software MIC PCR v2.2.0 para Rotor-Gene 3000/6000 MIC, el nivel del umbral no se movió manualmente en el análisis de las muestras.

Los métodos exactos pero sofisticados como la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) del virus requieren equipo y la infraestructura avanzados. Los análisis serológicos están ampliamente disponibles y pueden proporcionar una alternativa para apoyar el diagnóstico, sin embargo, pueden ocurrir reacciones cruzadas dando falsos positivos o falsos negativos debido a que la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que fue generado contra un antígeno diferente pero similar. Por definición, un anticuerpo es específico para un antígeno que lo crea. Sin embargo, muchos antígenos que ocurren naturalmente son una mezcla de macromoléculas. El contacto con un antígeno complejo como un virus estimula múltiples respuestas inmunitarias a las diferentes macromoléculas individuales que conforman el virus.

Es por lo que existen las reacciones cruzadas en las pruebas de inmunocromatografía, en este estudio se obtuvo dos resultados positivos por método serológico, que en PCR tiempo real se obtuvieron como no detectables (ver Anexo 35). Se pudo tener la reacción cruzada del virus dengue con otro *flavivirus*, sin embargo, se sabe que el virus Zika es un *flavivirus*, pero no se obtuvo muestras positivas por método PCR tiempo real multiplex con este virus. El centro nacional de epidemiología, SIGSA se presentaron 6 casos positivos para Dengue hasta la semana 20 y ningún caso de Zika y Chikungunya en el área de estudio.

La prueba inmunocromatografía aporta un valor importante en los casos en los que los pacientes han tenido ya cierto tiempo de síntomas y la respuesta inmune se ve evidenciada al detectar los anticuerpos contra los virus estudiados, en casos donde no se cuente con la tecnología molecular estas pruebas siguen aportando un valor diagnóstico importante para la detección y diagnóstico de estas enfermedades febriles.

EL diagnóstico de estos virus por medio de la clínica no es suficiente para asegurar que el paciente padece una enfermedad febril a causa de estos virus, ya que como se puede observar (ver Anexo 32) solo un paciente se presentó al laboratorio con rash, lo cual no hace un método diagnóstico certero para la diferenciación de estos virus.

## 10. CONCLUSIONES

1. Al correlacionar la prueba de inmunocromatografía y PCR tiempo real multiplex para virus dengue, se obtuvo mayor número de pruebas positivas para la técnica de inmunocromatografía. Esto pudo ser por alguna reacción cruzada.
2. La cantidad de pacientes portadores de la infección por virus dengue que asisten al Laboratorio Clínico los Almendros fue de 19 por métodos moleculares y 21 por método inmunocromatográfico.
3. No es posible asociar las características de infección de los virus para su diferenciación, ya que los 3 virus cuentan con síntomas parecidos.
4. No se logró detectar casos de Chikungunya y Zika entre los pacientes que asistieron al laboratorio Clínico los Almendros en el periodo de Abril-octubre del 2018, lo cual corresponde con lo reportado por SIGSA.

## **11. RECOMENDACIONES**

1. Promover investigación y estudios que contribuyan a llevar tecnología más avanzada para el diagnóstico clínico a lugares del interior de la república de Guatemala, como en el caso de Izabal.
2. Manejar toda la cadena de frío estrictamente necesaria al momento de trabajar técnicas moleculares con ARN virus.
3. Llevar a cabo un estricto control de calidad interno en el momento de procesar por medio de tecnología Molecular, ya que debe evidenciarse la trazabilidad del análisis.
4. Se recomienda continuar este estudio ampliando el periodo de tiempo, para lograr una mayor población evaluada.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. **Luis Alberto Gómez, Gladis Montoya, Hernán Mauricio Rivera, Juan Carlos Hernández.** Scielo. [En línea] 37, 2017. [Citado el: 04 de 02 de 2019.] <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37s1/0120-4157-bio-37-s1-00121.pdf>. 121-32.
2. **Myriam L. Velandia, Jaime E. Castellanos.** Scielo. [En línea] 15, 03 de 02 de 2011. [Citado el: 04 de 02 de 2019.] <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n1/v15n1a06.pdf>. 33-43.
3. **Dr. Liodelvio Martínez Fernández, Dra. Yeimy Paola Torrado Navarro.** Scielo. [En línea] 54, 20 de 02 de 2015. [Citado el: 04 de 02 de 2019.] <http://scielo.sld.cu/pdf/med/v54n1/med08115.pdf>.
4. **Jaramillo, Antonio Carlos.** "Infecciones por arbovirus". *Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal*. [En línea] no. 1, Vol. 5, (sin mes) de 2000. [Citado el: 28 de 02 de 2018.] pp 51-56. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69350111>>. ISSN 0122-0268.
5. **Arredondo-Garcia, JL y Mendez-Herrera, A y Medina-Cortina, H.** "Arbovirus en Latinoamérica". *SCIELO*. [En línea] Vol. 37, no. 2, 04 de 2016. [Citado el: 03 de 03 de 2018.] pp. 111-131. Disponible en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&nrm=iso). ISSN 2395-8235.
6. **Kantor, Isabel N.** Dengue, Zika y Chikungunya. *Revista Scielo*. [En línea] Vol. 76, No.2, 04 de 2016. [Citado el: 05 de 03 de 2018.] pp. 93-97. Disponible en [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802016000200006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802016000200006&lng=es&nrm=iso). ISSN 1669-9106..
7. **(OMS), Organización Mundial de la Salud.** "Respuesta mundial para el control de vectores". *who*. [En línea] Version 5.4, 10 de 2017. [Citado el: 05 de 03 de 2018.] Nota descriptiva. Disponible en

[http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf?ua=1).

8. **OPS Organizacion Panamericana de la Salud, OMS Organizacion Mundial de la Salud.** OPS OMS. *Dengue: Datos, mapas y estadísticas*. [En línea] 41, 27 de 10 de 2017. [Citado el: 10 de 03 de 2018.] [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es).

9. —. PAHO, OPS, OMS. *Número de casos reportados de Chikungunya en países o territorios de las Américas 2017*. [En línea] 50, 15 de 12 de 2017. [Citado el: 08 de 03 de 2018.] [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=43199&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43199&lang=es).

10. **PAHO Pan American Health Organization, WHO World Health Organization.** PAHO WHO. *Regional Zika Epidemiological Update (Americas)*. [En línea] 25 de 08 de 2017. [Citado el: 14 de 03 de 2018.] [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11599%3Aregional-zika-epidemiological-update-americas&catid=8424%3Acontents&Itemid=41691&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599%3Aregional-zika-epidemiological-update-americas&catid=8424%3Acontents&Itemid=41691&lang=en).

11. **Martinez Torres, Erick.** SciElo. *Dengue estudios avanzados*. [En línea] 64, Diciembre de 2008. [Citado el: 29 de 02 de 2018.] Vol. 22 pp. 33-52. En Linea <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142008000300004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142008000300004&lng=en&nrm=iso)>. ISSN 0103-4014.

12. **WHO, World Health Organization.** WHO. *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases*. [En línea] 1, 01 de 2000. [Citado el: 29 de 03 de 2018.] pp. 75-78. Disponible en <http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/dengue.pdf?ua=1>.



13. **CDC.** CDC Centro para Control y Prevencion de Enfermedades. *Historia y Datos sobre Dengue*. [En línea] 08 de 07 de 2015. [Citado el: 28 de 03 de 2018.] Disponible en <https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>. ISSN 30329-4027.
14. **Guatemala/EFE.** Suman 26 mil casos de chikungunya y 14 mil de dengue. *Prensa Libre*. 08 de Noviembre de 2015.
15. **OPS Organización Panamericana de la Salud, OMS Organización Mundial de la Salud.** El dengue, chikungunya y zika se pueden prevenir. *PAHO*. [En línea] 2015. [Citado el: 10 de 04 de 2018.] [https://www.paho.org/gut/index.php?option=com\\_content&view=article&id=817:el-dengue-chikungunya-y-zika-se-pueden-prevenir&Itemid=441](https://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=817:el-dengue-chikungunya-y-zika-se-pueden-prevenir&Itemid=441).
16. **Morales, Mario.** Dengue hemorrágico alarma a Zacapa; mueren dos niños en ocho días . *Prensa Libre*. 29 de 09 de 2017.
17. **Doctor César Augusto Durán, Tania María Lanza, Jorge Arturo Plata.** Cidbimena. *Fisiopatología y Diagnóstico del Dengue*. [En línea] Vol. 78, 2010. [Citado el: 11 de 04 de 2018.] <http://cidbimena.desastres.hn/RMH/pdf/2010/pdf/Vol78-3-2010-8.pdf>. No. 3.
18. **Guardado, Dr. Pablo.** UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DEL VALLE DE SULA. [En línea] 2015. [Citado el: 25 de 03 de 2018.] <http://www.bvs.hn/TMVS/pdf/TMVS6/pdf/TMVS6.pdf>.
19. **Adeline Catteau, Olga Kalinina, Marie-Christine Wagner, Vincent Deube.** *Journal of General Virology. microbiologyresearch*. [En línea] 2003. [Citado el: 25 de 03 de 2018.] <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/84/10/2781.pdf?expires=1529548587&id=id&accname=guest&checksum=9EEC47E37AC5EC749706B27AFFA62DCE>.

20. *Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells*, Christine Trumfheller, Jennifer Finke, Wellington Sun, Michael A. Eller. **Boonrat Tassaneetrithep, Timothy H. Burgess, Angela Granelli-Piperno.** 7, Rockefeller University Press : s.n., 07 de 04 de 2003, Journal of Experimental Medicine, Vol. 197, págs. 823-829. 1540-9538.
21. *Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity*. **Smi, Izabela A. Rodenhuis-Zybert•Jan Wilschu Jolanda M.** 04 de 2010, Researchgate PubMed, págs. 2773-2786.
22. *Dengue estructura, serotipos y epidemiología molecular*. **Laredo-Tiscareño, Stephanie Viridiana, Guo, Xianwu y Bocanegra-García, Virgilio.** 3, Mexico, Tamaulipas : CienciaUAT, 18 de 06 de 2012, Redalyc, CienciaUat, Vol. 6, págs. 27-23. 2007-7521.
23. *Infección por el virus del Chikungunya*. **RESTREPO JARAMILLO, BERTA NELLY.** [ed.] CES Med. n. 2, Medellín : s.n., Diciembre de 2014, Scielo, Vol. v. 28, págs. 313-323. ISSN 0120-8705.
24. *Approaches to the treatment of disease induced by chikungunya virus*. **Jayaram Bettadapura, Lara J. Herrero, Adam Taylor.** 15 de Octubre de 2013, The Indian Journal of Medical Research., Vol. v. 138, págs. 762-765.
25. *Chikungunya virus infection: an overview*. **Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L.** 26 de Mayo de 2013, NEW MICROBIOLOGICA, Vol. v. 36, págs. 221-227.
26. **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Departamento de Epidemiología.** *Semana Epidemiológica, No. 40 del 01 al 7 de octubre 2017.* SIGSA. Guatemala : Octubre, 2017. págs. 11-13, Boletín Informativo.
27. **Pan American Health Organization, World Health Organization.** *vigisalud.* [En línea] v. 1, Junio de 2014. [Citado el: 14 de Julio de 2018.]

[http://www.vigisalud.gov.py/documentos/01\\_07\\_2016\\_19\\_20\\_18\\_Informacion-para-profesionales-de-salud-sobre-chikungunya.pdf](http://www.vigisalud.gov.py/documentos/01_07_2016_19_20_18_Informacion-para-profesionales-de-salud-sobre-chikungunya.pdf).

28. **Organización Panamericana de la Salud (OPS), Center for Global Health (CDC).** Center for Global Health (CDC). *Organización Panamericana de la Salud (OPS)*. [En línea] 13 de Junio de 2011. [Citado el: 14 de Julio de 2018.] <http://www.binasss.sa.cr/chikungunya/cdc.pdf>. 978-92-75-31632-0.

29. **Pública, Ministerio de Salud.** Universidad Sancarlos de Guatemala. [En línea] v. 1, 2014. [Citado el: 20 de Julio de 2018.] [http://desastres.usac.edu.gt/sites/default/files/guia\\_chikv\\_imprensa\\_21-5-14.pdf](http://desastres.usac.edu.gt/sites/default/files/guia_chikv_imprensa_21-5-14.pdf). 978-9945-436-94-5.

30. *Virus chikungunya: Características virales y evolución genética.* **Guillermo Cervantes-Acosta, Homero Sanjuán-Vergara.** [ed.] Pedro Pablo Serna S. Juan Manuel Ruiz. No. 2, Barranquilla, Colombia : Desafíos en Salud Global, compromisos con las enfermedades crónicas no transmisibles y las enfermedades infecciosas, 9 de Marzo de 2016, Revista Científica Salud Uninorte, Vol. V. 32, págs. 290 - 305. 2011-7531.

31. **Cervantes-Acosta, Guillermo y Sanjuán-Vergara, Homero.** Virus chikungunya: Características virales y evolución genética. *Salud Uninorte*. [En línea] no. 2, Agosto de 2016. [Citado el: 24 de Julio de 2018.] Vol. 32. <http://www.redalyc.org/pdf/817/81748361011.pdf>. 0120-5552.

32. **Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K.** Euro Surveill. *Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia.* [En línea] Febrero de 2014. [Citado el: 20 de Junio de 2018.]

33. **Sanitarias, Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias.** Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Secretaría General de sanidad y consumo.* [En línea] 4 de Diciembre de 2015. [Citado el: 22 de Junio de 2018.]

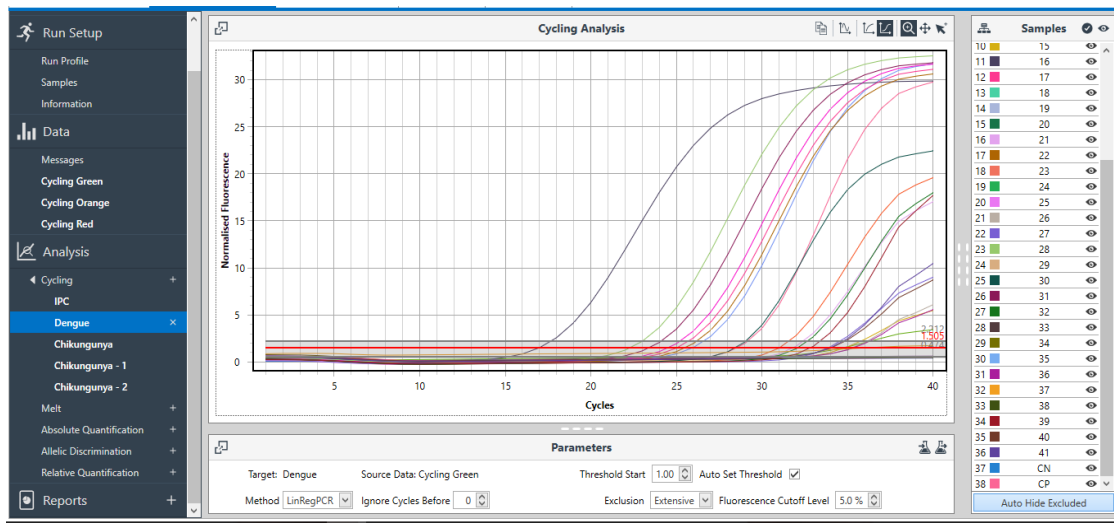
34. **Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D.** Evidence of perinatal transmission of Zika virus. *Euro Surveill.* [En línea] Diciembre de 2013. [Citado el: 25 de Julio de 2018.]
35. **Didier Musso, a Duane J. Gublerb,c.** Clinical Microbiology Reviews. *American Society For Microbiology.* [En línea] 9 de Mayo de 2016. [Citado el: 23 de Julio de 2018.] <http://cmr.asm.org/> on February 6, 2017 by guest.
36. **Salud, Organización Mundial de la.** Organización Mundial de la Salud. [En línea] 20 de Julio de 2018. [Citado el: 11 de Agosto de 2018.] [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus.](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus)
37. **Roberto De La Rosa Ramírez, Laura Mendoza Rosado.** Hospital Universidad del Norte. [En línea] 1, 04 de Junio de 2016. [Citado el: 2018 de Julio de 2018.] Volumen 15. [https://scp.com.co/wp-content/uploads/2016/04/6.-Infecci%C3%B3n-Zika.pdf.](https://scp.com.co/wp-content/uploads/2016/04/6.-Infecci%C3%B3n-Zika.pdf)
38. **Biotech, Inc. Gaamsa.** The New Wave of Diagnosis. San Diego : Biotech, 2006. págs. 1-2, Inserto . 92121.
39. **Tamay de Dios L, \* Ibarra C,\*\* Velasquillo C\*.** *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.* Mexico : s.n., 2013.
40. **UNED.** *Principios básicos de la manipulación genética.* 2000.
41. **Costa, Josep.** *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.* Barcelona : Hospital Clínic Provincial.
42. **Organizacion Panamericana de la Salud, OMS.** Paho. [En línea] 2016. [Citado el: 05 de 02 de 2019.] [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-deteccion-algoritmo-zikv.pdf.](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-deteccion-algoritmo-zikv.pdf)
43. **Perez, Maria Irene.** Laboratorio de Urgencias. [En línea] 8, 2017. [Citado el: 15 de 01 de 2019.] Volumen 1, Pag. 52.

44. **Diagnostics, Fast-track.** Fasttrack Diagnostics. [En línea] 03 de 05 de 2016. [Citado el: 04 de 12 de 2018.] <http://www.fast-trackdiagnostics.com/>.
45. **Biotech.** Importadora Americana. [En línea] 01 de 06 de 2006. [Citado el: 12 de 03 de 2019.] <https://www.importadoraamericana.com/categoria-producto/ctk-biotech/>. 3.
46. **Roche.** Life Science. [En línea] 04 de 06 de 2011. [Citado el: 03 de 12 de 2018.] [https://lifescience.roche.com/global\\_en/products/high-pure-viral-rna-kit.html](https://lifescience.roche.com/global_en/products/high-pure-viral-rna-kit.html).
47. **Oswald, Dr Nick.** Bitesize Bio. *Bitesize Bio*. [En línea] 1.5, Bitesize Bio, 4 de 8 de 2014. [Citado el: 7 de 2 de 2019.] <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>. 1.
48. *Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells.* **Rodolphe Hamela, Ophélie Dejarnac, Sineewanlaya Wichita, Peeraya Ekchariyawata, Aymeric Neyret, Natthanej Luplertlop, Manuel Perera-Lecoin, Pornapat Surasombatpattanae, Loïc Talignania, Frédéric Thomas, Van-Mai Cao-Lormeuf, Valérie Choumet, Laurenc.** 2015, American Society for Microbiology/ Journal of Virology, pág. 1.

## 13. ANEXOS

### Anexo 1 Muestras Detectables para DENV

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 1)

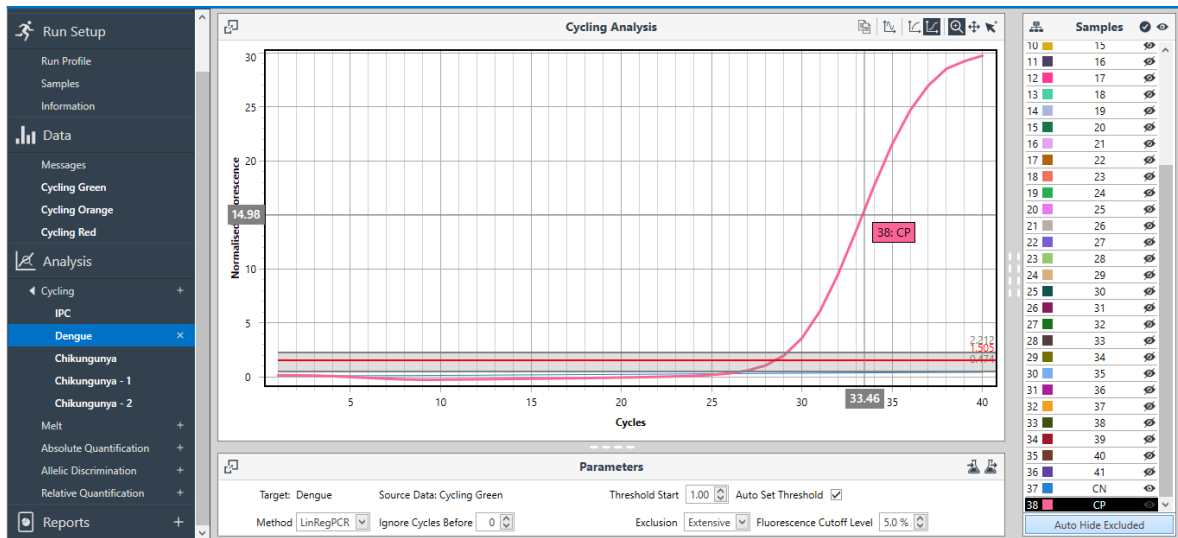


Fuente: Datos experimentales

En la imagen No. 1 se muestran las curvas de amplificación exponencial para DENV de las muestras del Laboratorio Los Almendros de Morales Izabal.

## Anexo 2 Control positivo para Dengue

Amplificación - detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 2)

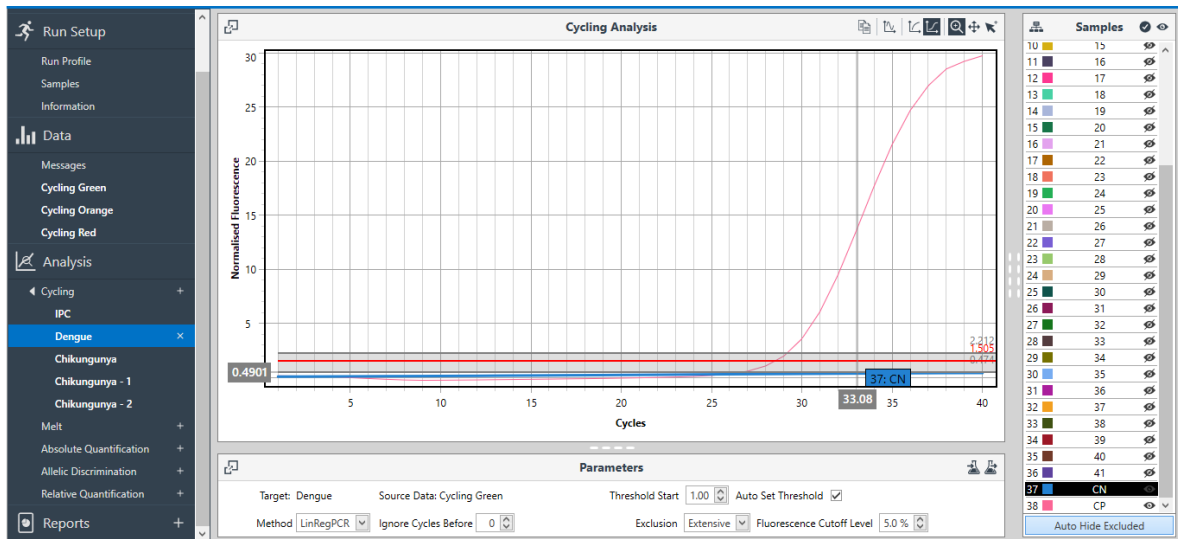


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 2 se muestra la traza de amplificación exponencial y cae por debajo de Ct o Cq 33 (Imagen No.8), control positivo del kit Fast- TrackDiagnostics.

### Anexo 3 Control Negativo

Amplificación - detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 3)



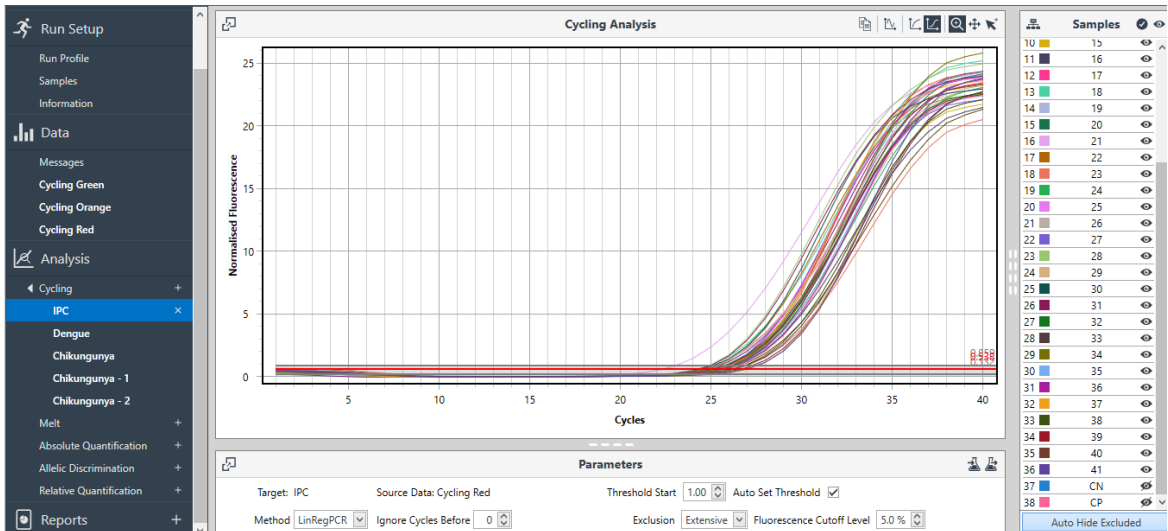
Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 3 se muestra el control Negativo por debajo del umbral



## Anexo 4 Control Positivo Interno (IPC o IC)

Amplificación - detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 4)

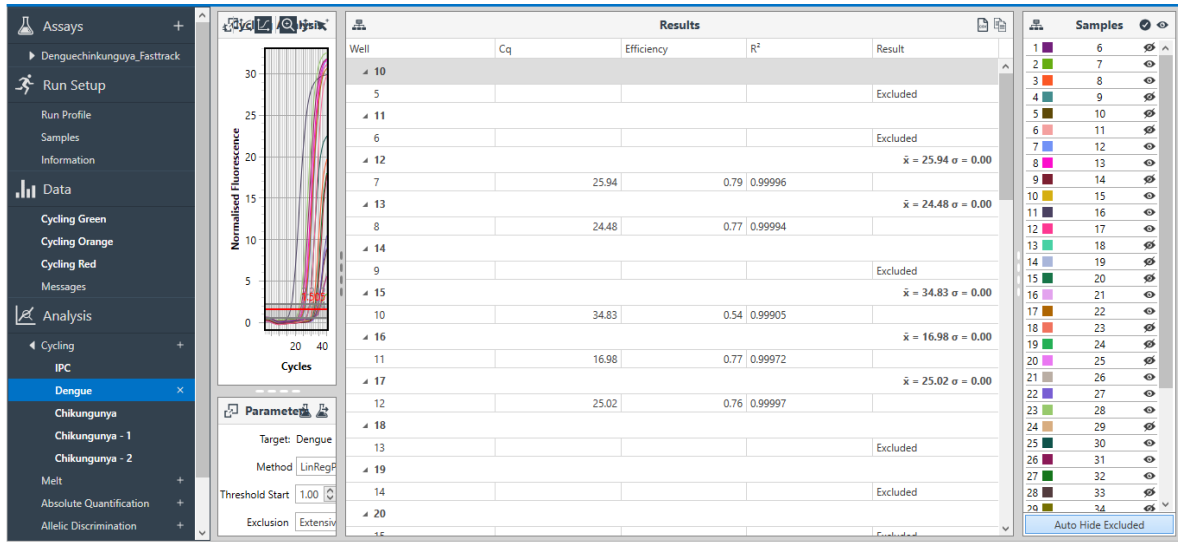


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 4 se muestra la traza de amplificación exponencial. El Control Interno fue agregado a cada muestra en el momento de la extracción.

## Anexo 5 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 10 – 19

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 5)

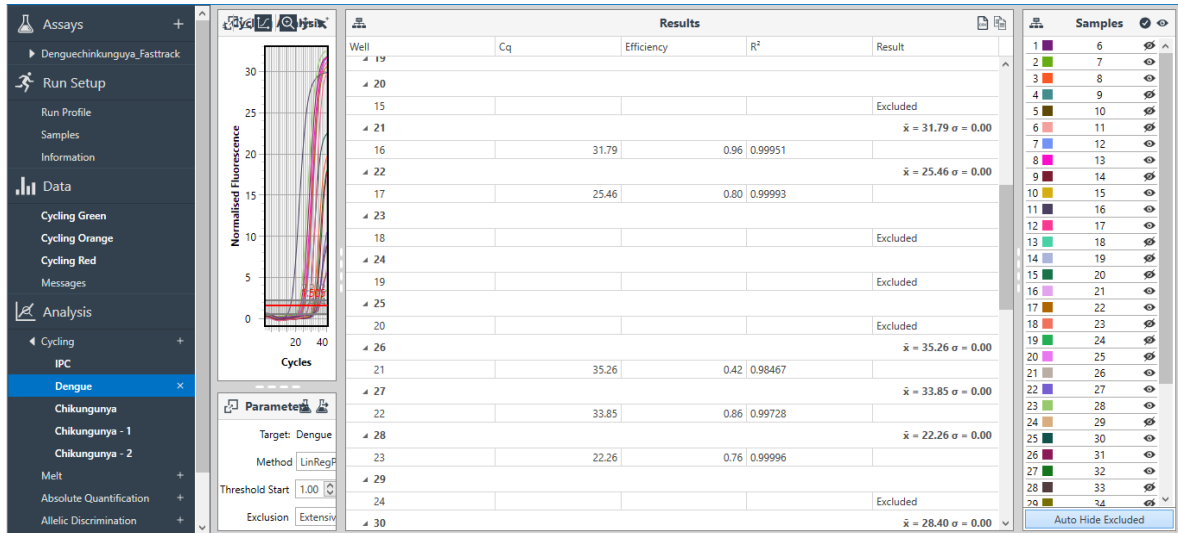


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 5 se muestran los valores de Cq para muestras detectables.

## Anexo 6 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 20-29

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 6)

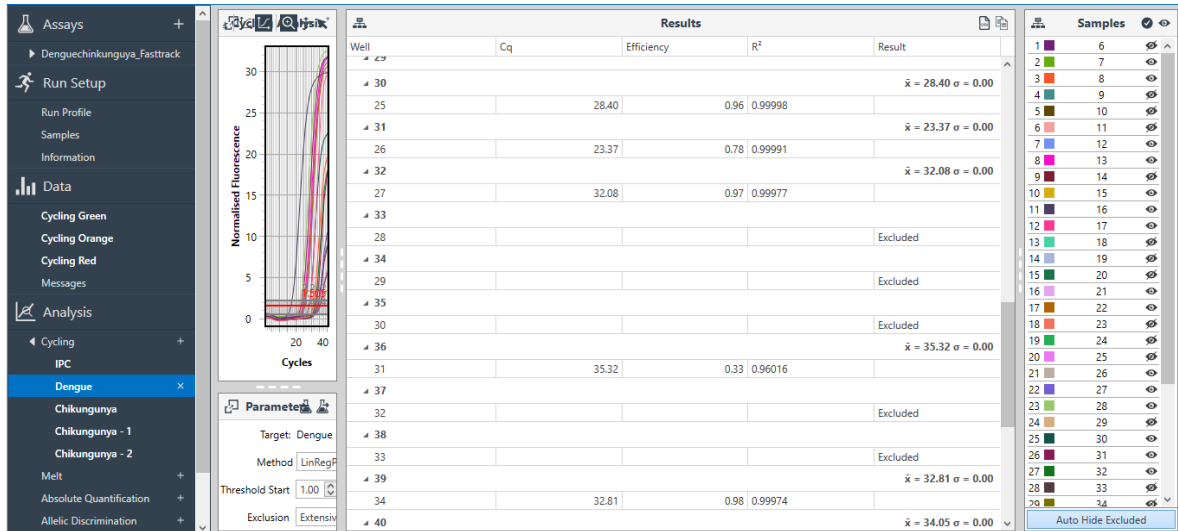


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 6 se muestran los valores de Cq para muestras detectables.

## Anexo 7 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 30-40

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 7)



Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 7 se muestran los valores de Cq para muestras detectables.

## Anexo 8 Valor de cuantificación del ciclo (Cq) de la muestra No. 41-CP

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 8)

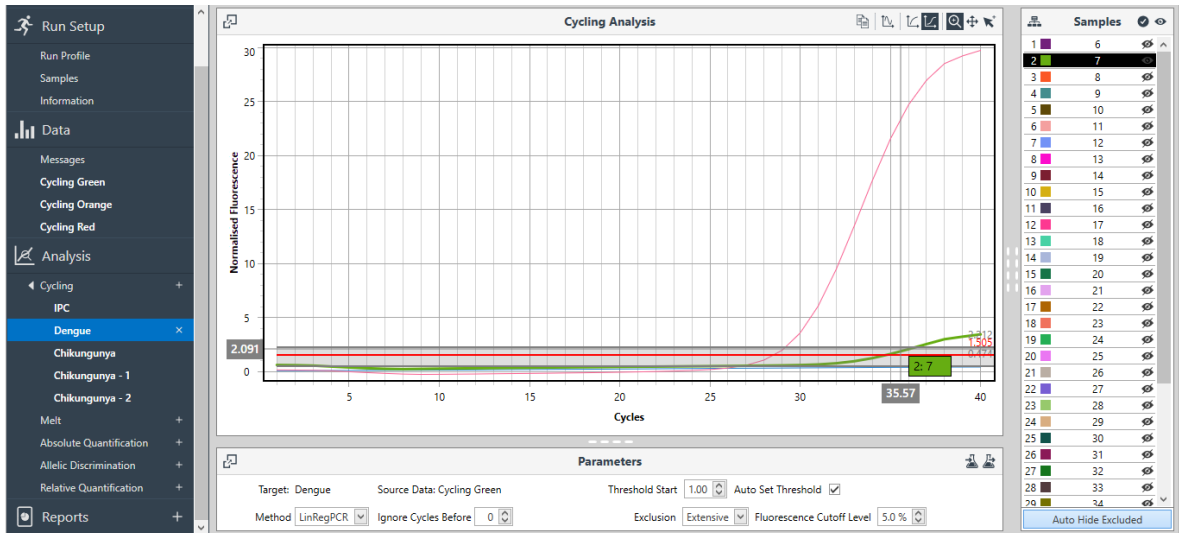


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 8 se muestran los valores de Cq para muestras detectables.

## Anexo 9 Muestra Detectable para DENV No. 7

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 9)

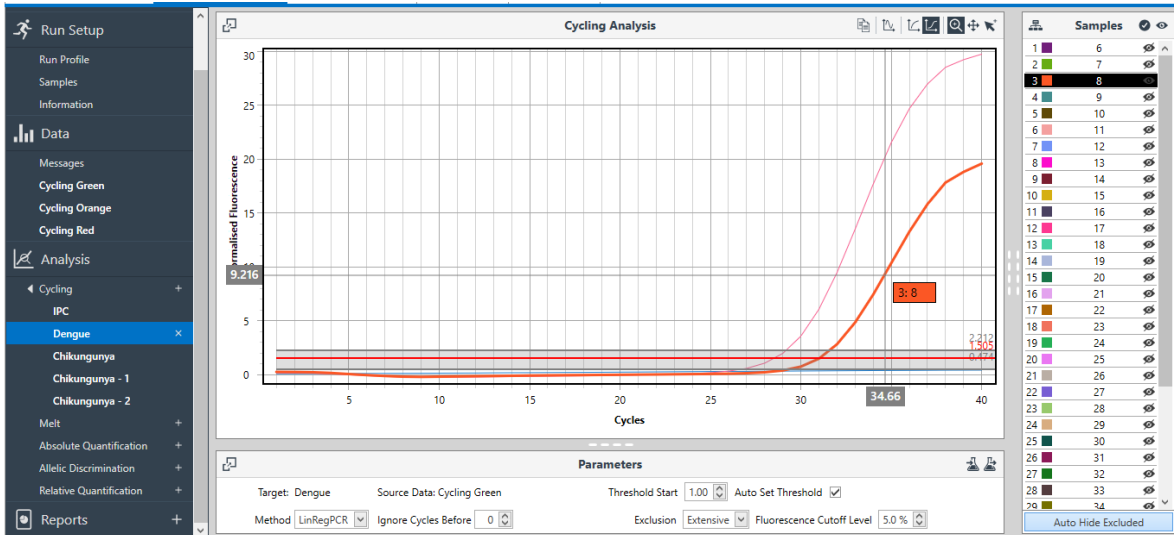


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.8 se muestra la traza de amplificación exponencial de color verde y de color rosado el control positivo.

## Anexo 10 Muestra Detectable para DENV No. 8

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 10)

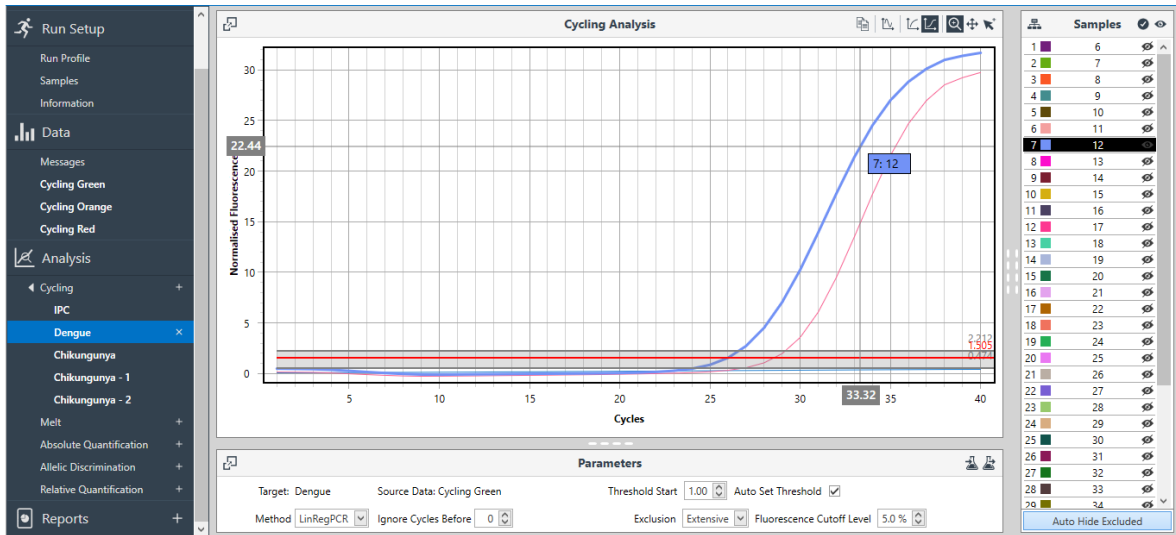


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.10 se muestra la traza de amplificación exponencial de color naranja y de color rosado el control positivo.

## Anexo 11 Muestra Detectable para DENV No. 12

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 11)



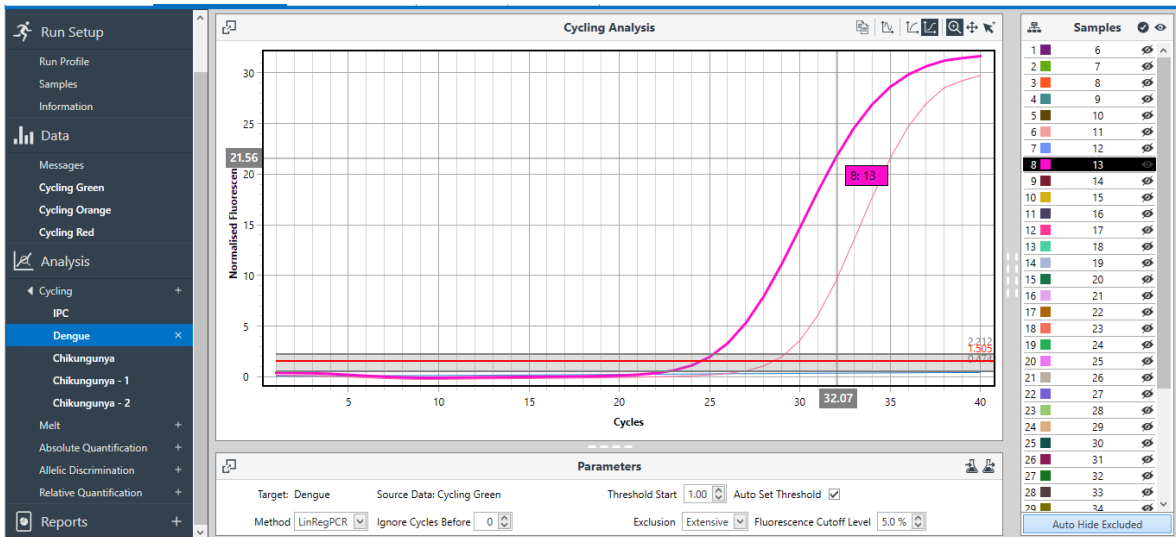
Fuente: Datos experimentales.

Imagen No.11 se muestra la traza de amplificación exponencial de color azul y de color rosado el control positivo.



## Anexo 12 Muestra Detectable para DENV No. 13

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 12)

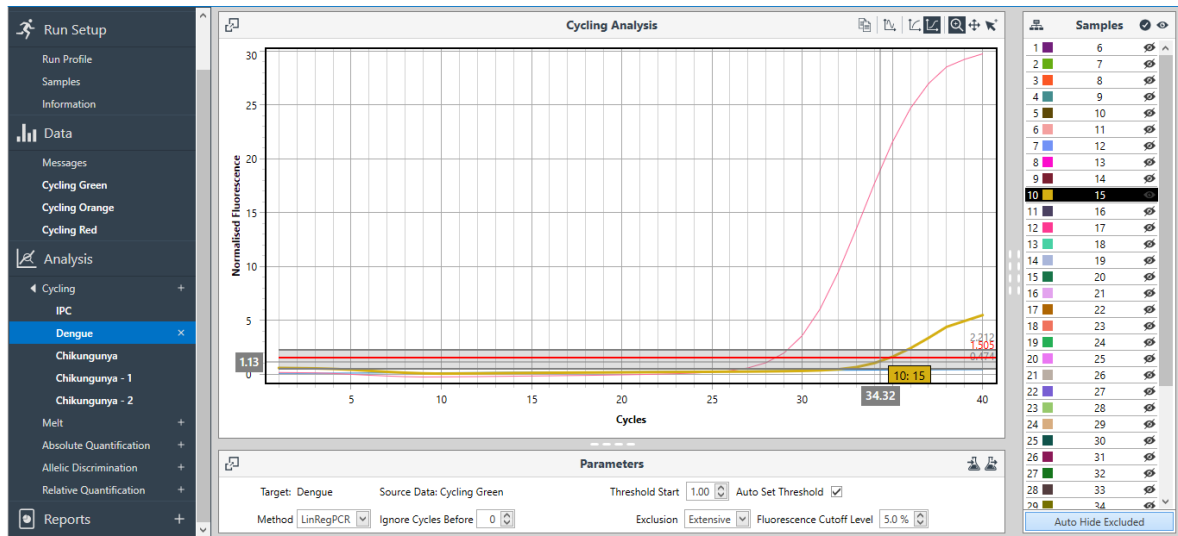


Fuente: Datos experimentales.

Imagen No.12 se muestra la traza de amplificación exponencial de color fucsia y de color rosado el control positivo.

## Anexo 13 Muestra Detectable para DENV No. 15

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 13)

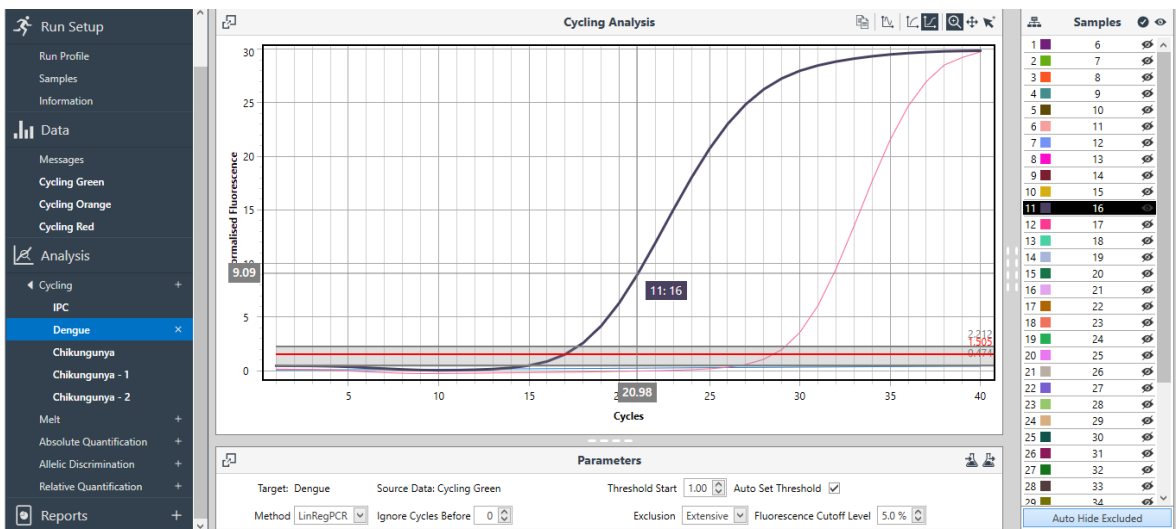


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.13 se muestra la traza de amplificación exponencial de color mostaza y de color rosado el control positivo.

## Anexo 14 Muestra Detectable para DENV No. 16

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 14)

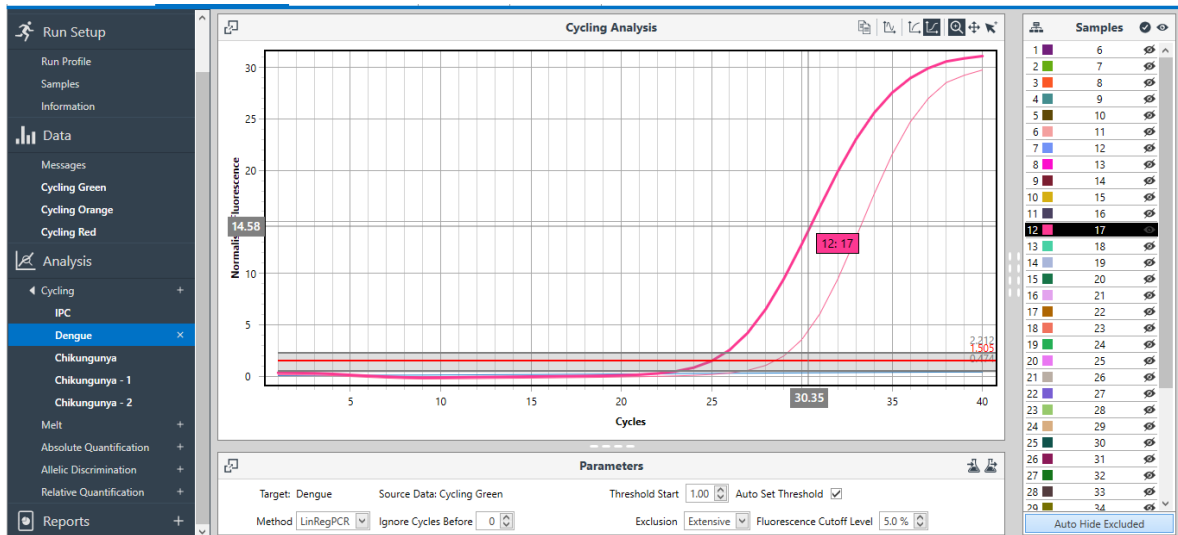


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.14 se muestra la traza de amplificación exponencial de color negro y de color rosado el control positivo.

## Anexo 15 Muestra Detectable para DENV No. 17

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y  
amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 15)

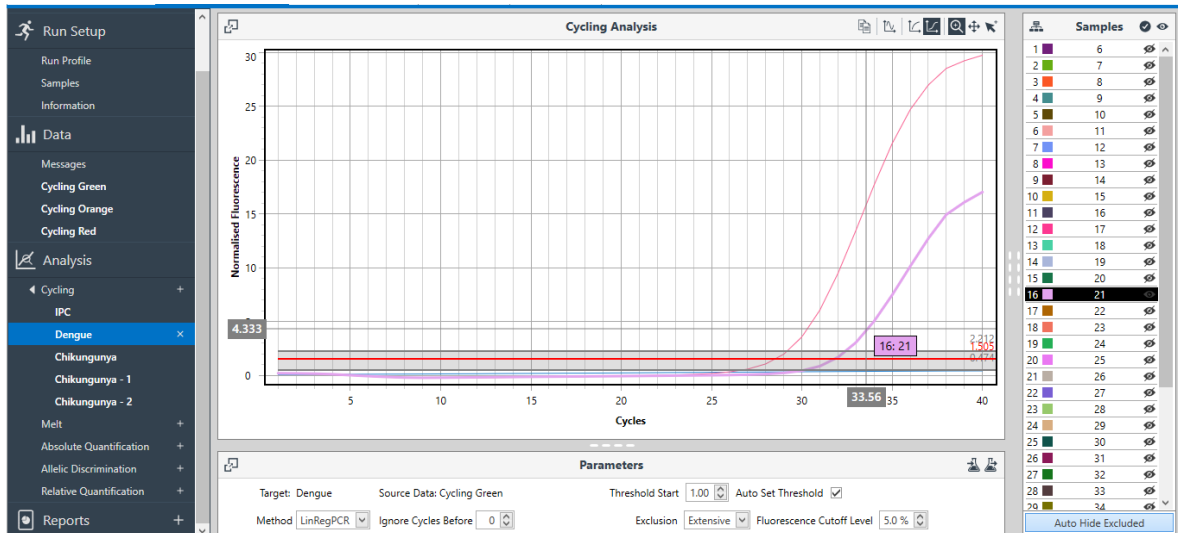


Fuente: Datos experimentales.

Imagen No.15 se muestra la traza de amplificación exponencial de color fucsia y de color rosado el control positivo.

## Anexo 16 Muestra Detectable para DENV No. 21

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 16)

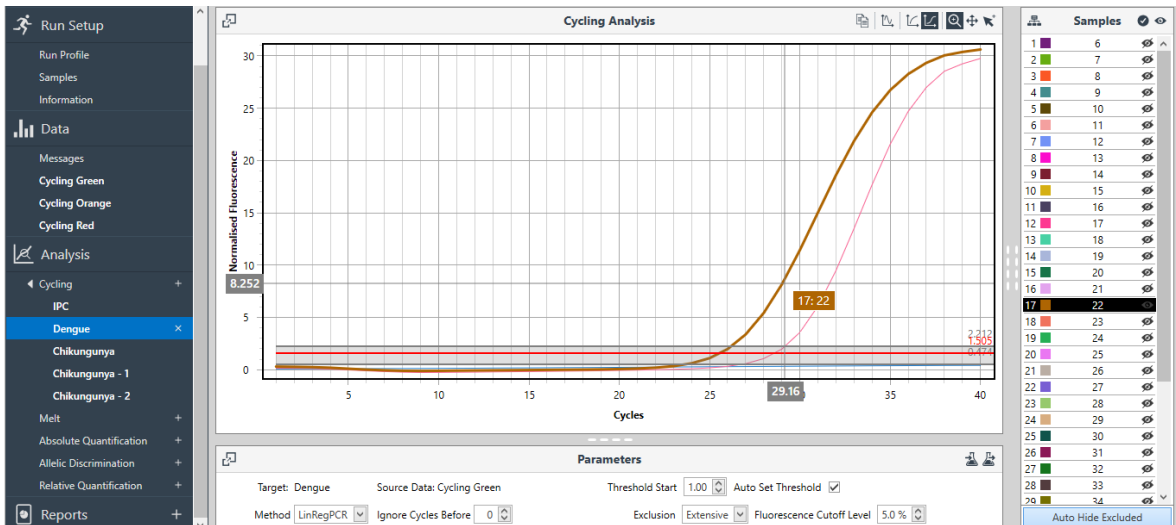


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.16 se muestra la traza de amplificación exponencial de color moradopálido y de color rosado el control positivo.

## Anexo 17 Muestra Detectable para DENV No. 22

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 17)

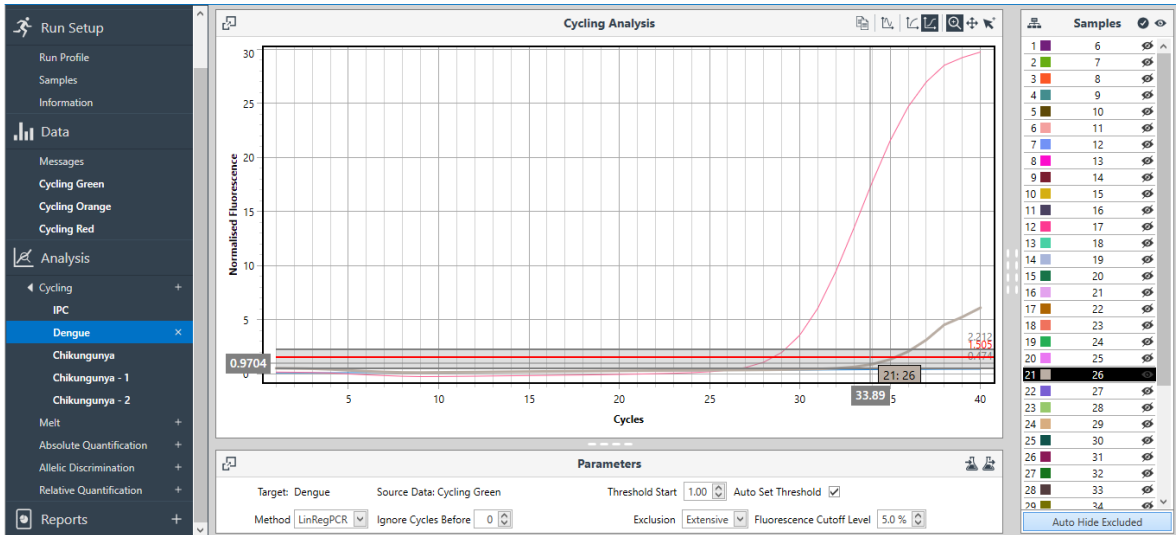


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.17 se muestra la traza de amplificación exponencial de color café y de color rosado el control positivo.

## Anexo 18 Muestra Detectable para DENV No. 26

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 18)

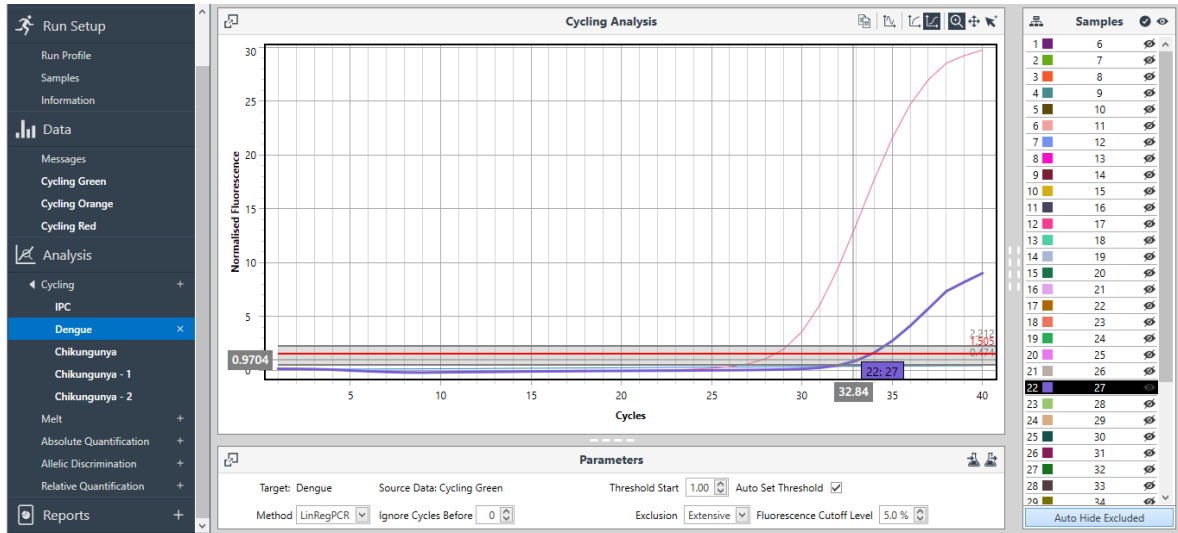


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.18 se muestra la traza de amplificación exponencial de color café claro y de color rosado el control positivo.

## Anexo 19 Muestra Detectable para DENV No. 27

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 19)



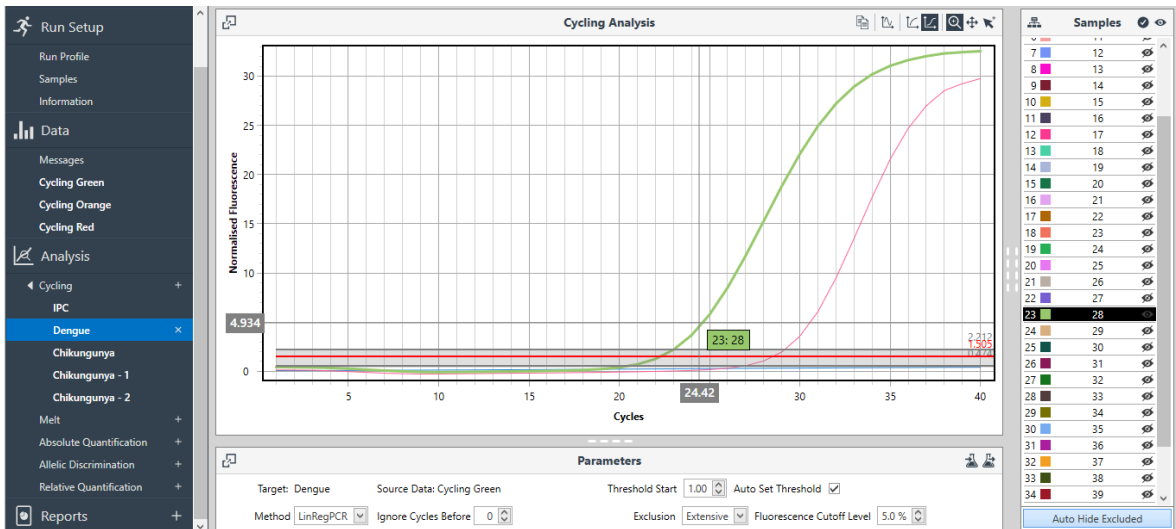
Fuente: Datos experimentales

Imagen No.19 se muestra la traza de amplificación exponencial de color morado y de color rosado el control positivo.



## Anexo 20 Muestra Detectable para DENV No. 28

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 20)

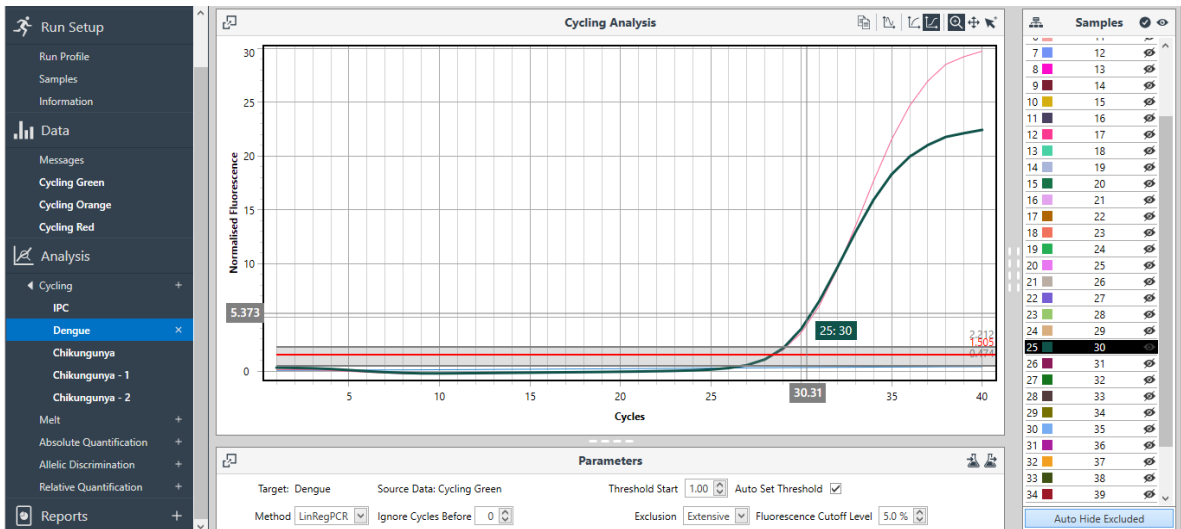


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.20 se muestra la traza de amplificación exponencial de color verde y de color rosado el control positivo.

## Anexo 21 Muestra Detectable para DENV No. 30

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 21)

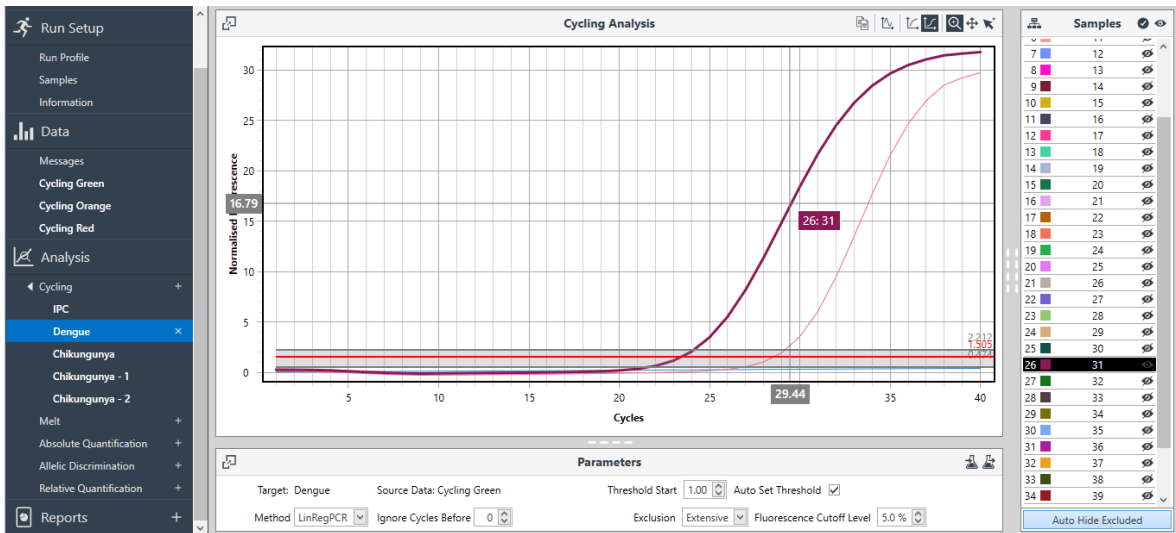


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.21 se muestra la traza de amplificación exponencial de color verde y de color rosado el control positivo.

## Anexo 22 Muestra Detectable para DENV No. 31

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 22)

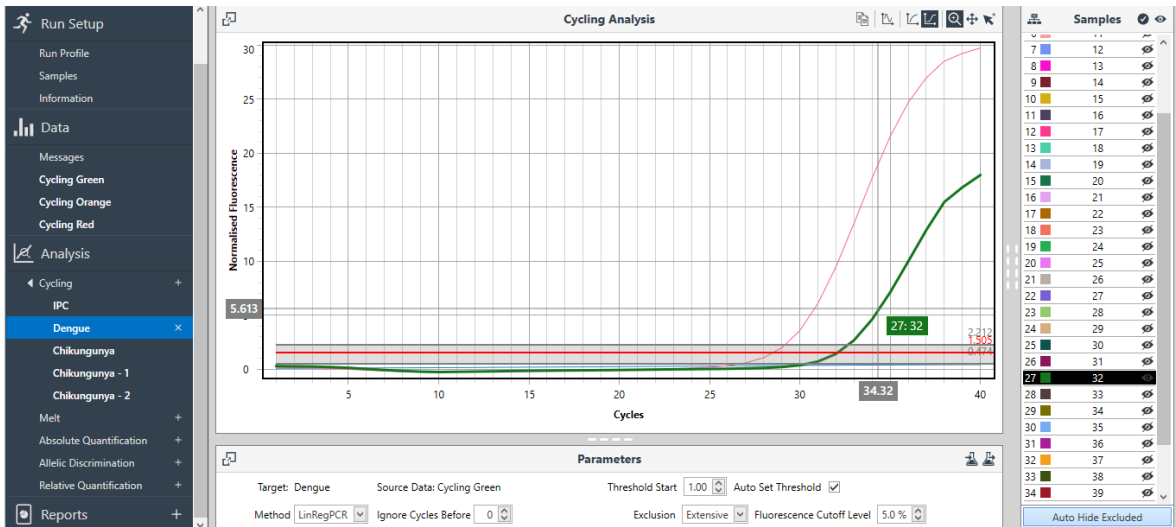


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.22 se muestra la traza de amplificación exponencial de color Corinto y de color rosado el control positivo.

## Anexo 23 Muestra Detectable para DENV No. 32

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 23)

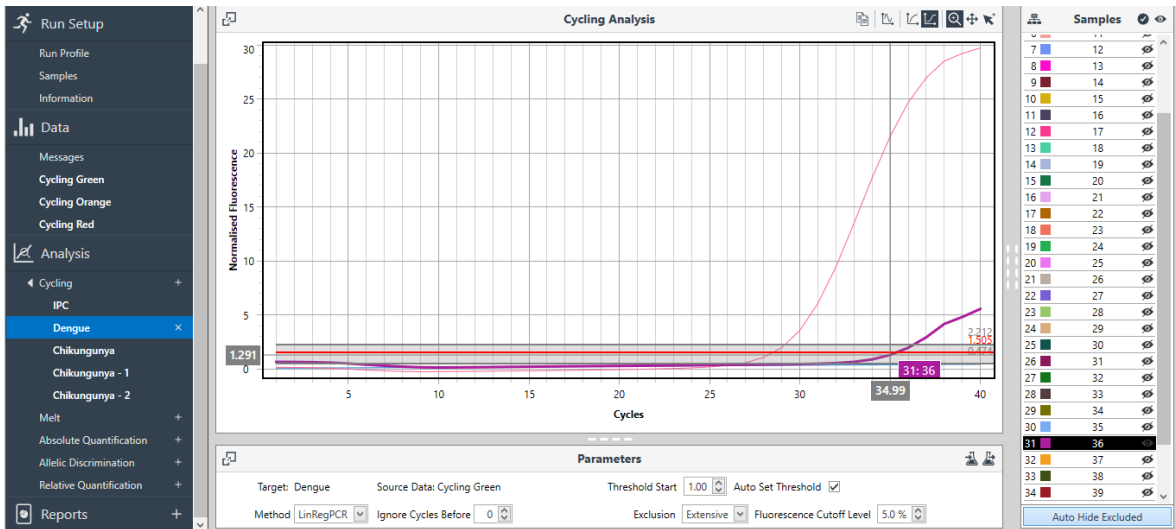


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.23 se muestra la traza de amplificación exponencial de color verde y de color rosado el control positivo.

## Anexo 24 Muestra Detectable para DENV No. 36

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 24)

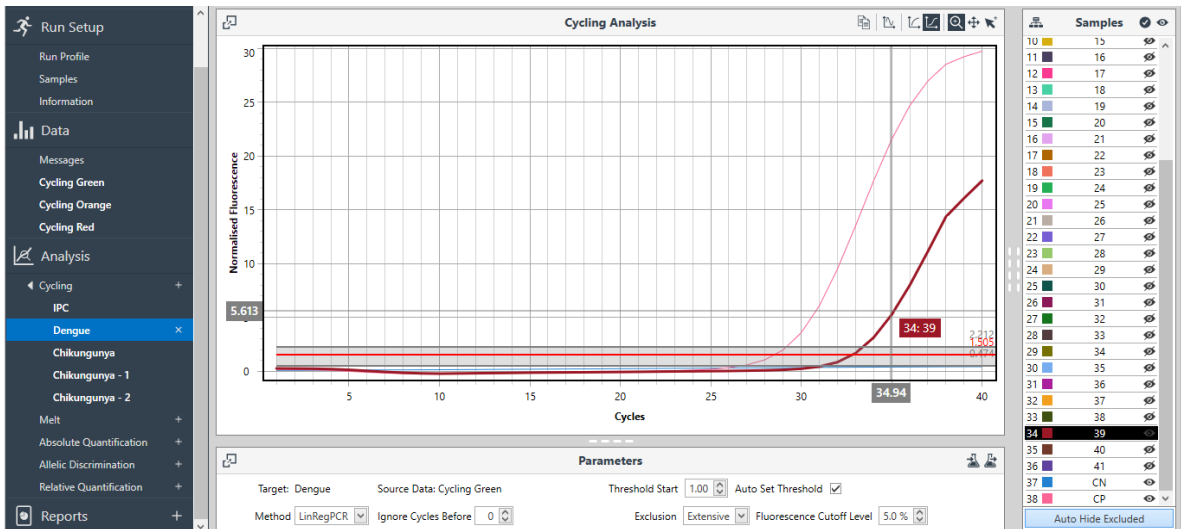


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.24 se muestra la traza de amplificación exponencial de color morado y de color rosado el control positivo.

## Anexo 25 Muestra Detectable para DENV No. 39

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 25)

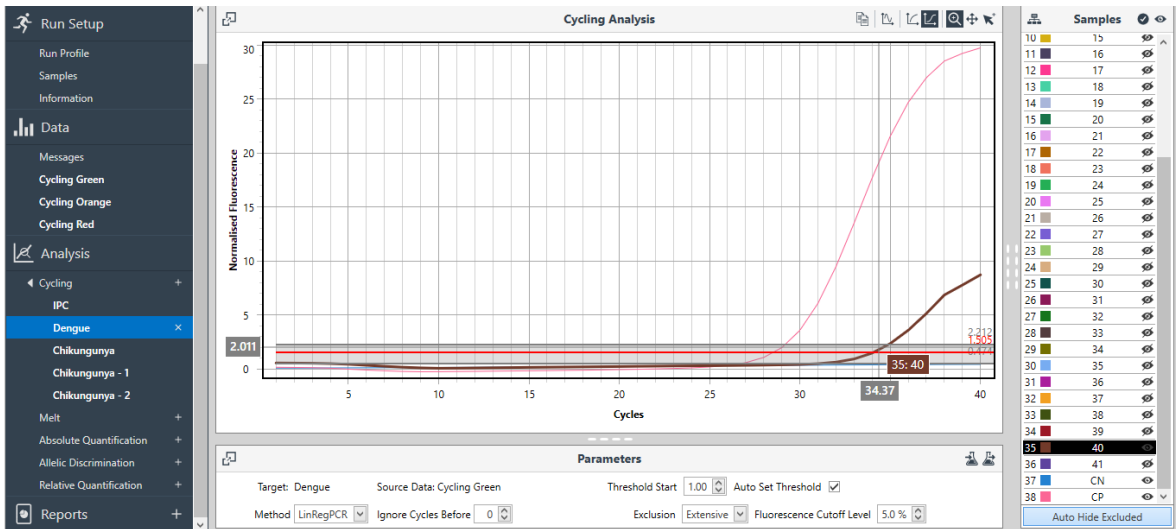


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.25 se muestra la traza de amplificación exponencial de color Corinto y de color rosado el control positivo.

## Anexo 26 Muestra Detectable para DENV No. 40

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 26)

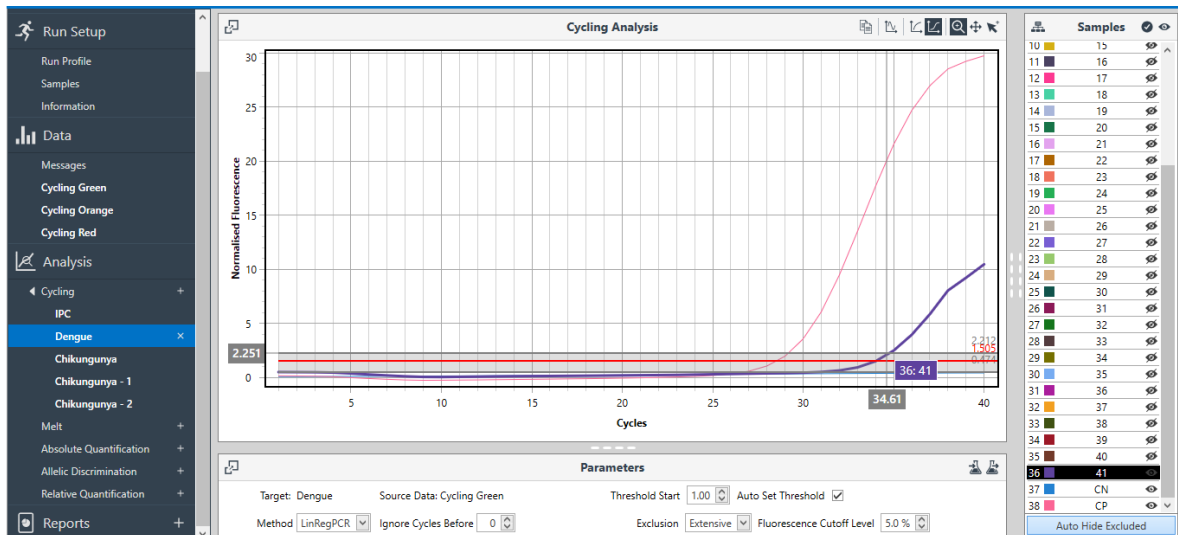


Fuente: Datos experimentales

Imagen No.26 se muestra la traza de amplificación exponencial de color café y de color rosado el control positivo.

## Anexo 27 Muestra Detectable para DENV No. 41

Extracción de ARN viral mediante el kit High Pure Viral RNA de Roche y amplificación – detección por el kit Fast-TrackDiagnostics. (Imagen No. 27)



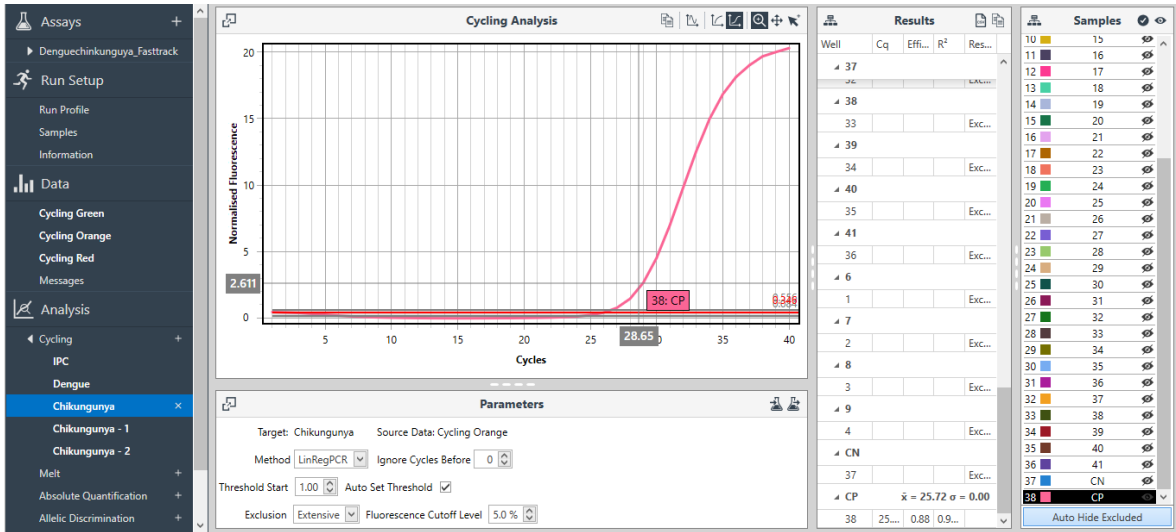
Fuente: Datos experimentales

Imagen No.27 se muestra la traza de amplificación exponencial de color morado y de color rosado el control positivo.



## Anexo 28 Control positivo para CHICKV

Amplificación – detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 28)

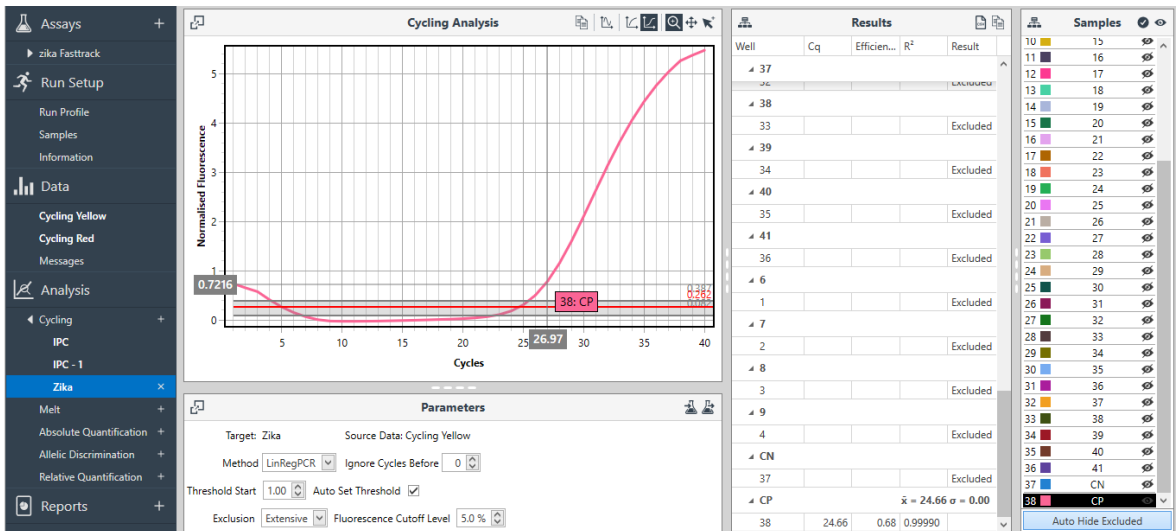


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 28 se muestra la traza de amplificación exponencial y cae por debajo de Ct 33 control positivo del kit Fast- TrackDiagnostics.

## Anexo 29 Control positivo para ZIKV

Amplificación – detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 29)

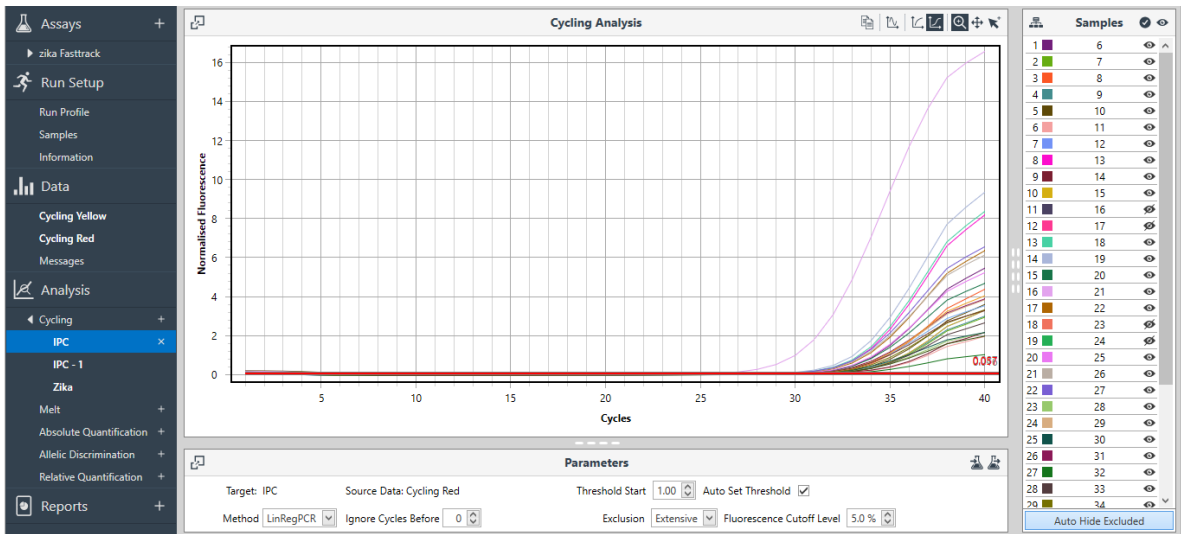


Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 29 se muestra la traza de amplificación exponencial y cae por debajo de Ct 33.

## Anexo 30 Control Positivo Interno (IPC o IC) ZIKV

Amplificación - detección por el kit Fast- TrackDiagnostics. (Imagen No. 30)



Fuente: Datos experimentales

Imagen No. 30 se muestra la traza de amplificación exponencial.

**Anexo 31 Muestras analizadas por medio de PCR tiempo real para los tres virus**

No. Muestra	Dengue	Chikungunya	Zika
18042825	No detectable	No detectable	No detectable
18071239	No detectable	No detectable	No detectable
18071242	No detectable	No detectable	No detectable
18071246	No detectable	No detectable	No detectable
18071247	No detectable	No detectable	No detectable
18071248	No detectable	No detectable	No detectable
18071549	No detectable	No detectable	No detectable
18071552	No detectable	No detectable	No detectable
18080272	No detectable	No detectable	No detectable
18080373	No detectable	No detectable	No detectable
18080374	No detectable	No detectable	No detectable
18080375	No detectable	No detectable	No detectable
18080576	No detectable	No detectable	No detectable
18092406	No detectable	No detectable	No detectable
18092407	Detectable	No detectable	No detectable
18092708	Detectable	No detectable	No detectable
18092709	No detectable	No detectable	No detectable
18092710	No detectable	No detectable	No detectable
18092711	No detectable	No detectable	No detectable
18092712	Detectable	No detectable	No detectable

18092713	Detectable	No detectable	No detectable
18092714	No detectable	No detectable	No detectable
18092715	Detectable	No detectable	No detectable
18092816	Detectable	No detectable	No detectable
18092817	Detectable	No detectable	No detectable
18092818	No detectable	No detectable	No detectable
18092919	No detectable	No detectable	No detectable
18092920	No detectable	No detectable	No detectable
18100121	Detectable	No detectable	No detectable
18100122	Detectable	No detectable	No detectable
18100223	No detectable	No detectable	No detectable
18100224	No detectable	No detectable	No detectable
18100225	No detectable	No detectable	No detectable
18100226	Detectable	No detectable	No detectable
18100427	Detectable	No detectable	No detectable
18100428	Detectable	No detectable	No detectable
18100529	No detectable	No detectable	No detectable
18100530	Detectable	No detectable	No detectable
18100531	Detectable	No detectable	No detectable
18100932	Detectable	No detectable	No detectable

18100933	No detectable	No detectable	No detectable
18100934	No detectable	No detectable	No detectable
18100935	No detectable	No detectable	No detectable
18100936	Detectable	No detectable	No detectable
18101037	No detectable	No detectable	No detectable
18101138	No detectable	No detectable	No detectable
18101239	Detectable	No detectable	No detectable
18101540	Detectable	No detectable	No detectable
18110241	Detectable	No detectable	No detectable

Fuente: Datos experimentales

### **Anexo 32 Comparación de síntomas de pacientes para dengue Detectable por medio de PCR tiempo real**

Se observó que un paciente presento salpullido y tres pacientes no presentaron dolor de cabeza ni dolor articular para las muestras detectables para dengue por medio de PCR en tiempo real.

No. Muestra	síntomas	Dengue
18092407	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18092708	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18092712	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18092713	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18092715	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18092816	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable

18092817	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18100121	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18100122	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18100226	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18100427	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18100428	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18100530	Sarpullido, Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18100531	Dolor muscular, fiebre, Dolor de cabeza	Detectable
18100932	Dolor muscular, fiebre, dolor articular	Detectable
18100936	Dolor muscular, fiebre, dolor articular	Detectable
18101239	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable
18101540	Dolor muscular, fiebre, dolor articular	Detectable
18110241	Dolor muscular, fiebre, dolor articular, dolor de cabeza	Detectable

Fuente: Datos experimentales

### **Anexo 33 Análisis de muestras por medio del Ct para virus dengue PCR en tiempo real**

Se observan las 49 muestras analizadas por método de PCR tiempo real, de las cuales 19 resultaron detectables para el virus del Dengue.

<b>No. Muestra</b>	<b>Ct</b>	<b>Interpretación</b>
18042825	38.1	No detectable
18071239	36.71	No detectable
18071242	38.23	No detectable
18071246	39.04	No detectable
18071247	36.67	No detectable
18071248	36.89	No detectable
18071549	38.32	No detectable
18071552	37.89	No detectable
18080272	39.12	No detectable
18080373	36.98	No detectable
18080374	37.76	No detectable
18080375	37.45	No detectable
18080576	36.53	No detectable
18092406	38.25	No detectable
18092407	34.71	<b>Detectable</b>
18092708	31.02	<b>Detectable</b>
18092709	36.87	No detectable
18092710	37.09	No detectable
18092711	36.02	No detectable
18092712	25.94	<b>Detectable</b>
18092713	24.48	<b>Detectable</b>
18092714	36.26	No detectable
18092715	34.83	<b>Detectable</b>
18092816	16.98	<b>Detectable</b>
18092817	25.02	<b>Detectable</b>
18092818	38.45	No detectable
18092919	36.61	No detectable
18092920	37.74	No detectable
18100121	31.79	<b>Detectable</b>
18100122	25.46	<b>Detectable</b>



18100223	36.35	No detectable
18100224	38.21	No detectable
18100225	37.89	No detectable
18100226	35.26	Detectable
18100427	33.85	Detectable
18100428	22.26	Detectable
18100529	36.57	No detectable
18100530	28.4	Detectable
18100531	23.37	Detectable
18100932	32.08	Detectable
18100933	37.9	No detectable
18100934	36.34	No detectable
18100935	38.89	No detectable
18100936	35.32	Detectable
18101037	37.87	No detectable
18101138	37.56	No detectable
18101239	32.81	Detectable
18101540	34.05	Detectable
18110241	34.01	Detectable

Fuente: Datos experimentales

### **Anexo 34 Análisis de muestras por medio serológico de inmunocromatografía para virus del Dengue marca Biotech CTK Dengue**

Se observan las 49 muestras analizadas por método serológico, de las cuales 21 muestras resultaron positivas para virus dengue

<b>No. Muestra</b>	<b>Dengue</b>
18042825	Negativo
18071239	Negativo
18071242	Negativo
18071246	Negativo
18071247	Negativo
18071248	Negativo
18071549	Negativo

18071552	Negativo
18080272	Negativo
18080373	Negativo
18080374	Negativo
18080375	Negativo
18080576	Negativo
18092406	Negativo
18092407	Positivo
18092708	Positivo
18092709	Negativo
18092710	Negativo
18092711	Negativo
18092712	Positivo
18092713	Positivo
18092714	Negativo
18092715	Positivo
18092816	Positivo
18092817	Positivo
18092818	Negativo
18092919	Negativo
18092920	Negativo
18100121	Positivo
18100122	Positivo
18100223	Negativo
18100224	Negativo
18100225	Negativo
18100226	Positivo
18100427	Positivo
18100428	Positivo
18100529	Negativo
18100530	Positivo
18100531	Positivo
18100932	Positivo
18100933	Negativo
18100934	Negativo
18100935	Negativo
18100936	Positivo

18101037	Positivo
18101138	Positivo
18101239	Positivo
18101540	Positivo
18110241	Positivo

Fuente: Datos experimentales

### Anexo 35 Comparación entre PCR tiempo real y método serológico Inmuncromatográfico para virus dengue

Se observa la comparación entre el método de PCR tiempo real y serología inmuncromatografica. De la cual se obtuvieron 19 resultados detectables para Dengue por medio de pcr y 21 positivos por serología inmuncromatografía.

No. Muestra	PCR en tiempo real	Serología Inmuncromatografía
18042825	No detectable	Negativo
18071239	No detectable	Negativo
18071242	No detectable	Negativo
18071246	No detectable	Negativo
18071247	No detectable	Negativo
18071248	No detectable	Negativo
18071549	No detectable	Negativo
18071552	No detectable	Negativo
18080272	No detectable	Negativo
18080373	No detectable	Negativo
18080374	No detectable	Negativo
18080375	No detectable	Negativo
18080576	No detectable	Negativo
18092406	No detectable	Negativo
18092407	Detectable	Positivo
18092708	Detectable	Positivo
18092709	No detectable	Negativo
18092710	No detectable	Negativo
18092711	No detectable	Negativo
18092712	Detectable	Positivo
18092713	Detectable	Positivo
18092714	No detectable	Negativo

18092715	Detectable	Positivo
18092816	Detectable	Positivo
18092817	Detectable	Positivo
18092818	No detectable	Negativo
18092919	No detectable	Negativo
18092920	No detectable	Negativo
18100121	Detectable	Positivo
18100122	Detectable	Positivo
18100223	No detectable	Negativo
18100224	No detectable	Negativo
18100225	No detectable	Negativo
18100226	Detectable	Positivo
18100427	Detectable	Positivo
18100428	Detectable	Positivo
18100529	No detectable	Negativo
18100530	Detectable	Positivo
18100531	Detectable	Positivo
18100932	Detectable	Positivo
18100933	No detectable	Negativo
18100934	No detectable	Negativo
18100935	No detectable	Negativo
18100936	Detectable	Positivo
18101037	No detectable	Positivo
18101138	No detectable	Positivo
18101239	Detectable	Positivo
18101540	Detectable	Positivo
18110241	Detectable	Positivo

Fuente: Datos experimentales

**Anexo 36 Se Muestran las cantidades de reactivos que se necesitan para 1, 9,32 y 64 pocillos para el mastemix**

Numero de reacciones		1	9	32	64
FTD-84-32/64	Buffer	12.5µl	112.5 µl	400 µl	800 µl
	Ppmix	1.5µl	13.5 µl	48 µl	96 µl
	Enzyme	1µl	9 µl	32 µl	64 µl
	Total	15µ	135 µl	480 µl	960 µl

Fuente: (44)

## 14. APENDICES

### Apéndices 1 Hielera eléctrica

Hilera eléctrica utilizada para mantener la cadena de frío en el transporte de muestras.



### Apéndices 2 Transporte de muestras

Transporte de muestras (plasma congelado)



**Apendices 3 Nunc  
Labtopcoolers**

Nunc LabtopCoolers -20°C  
Utilizado para mantener la  
cadena de frio en el transporte.



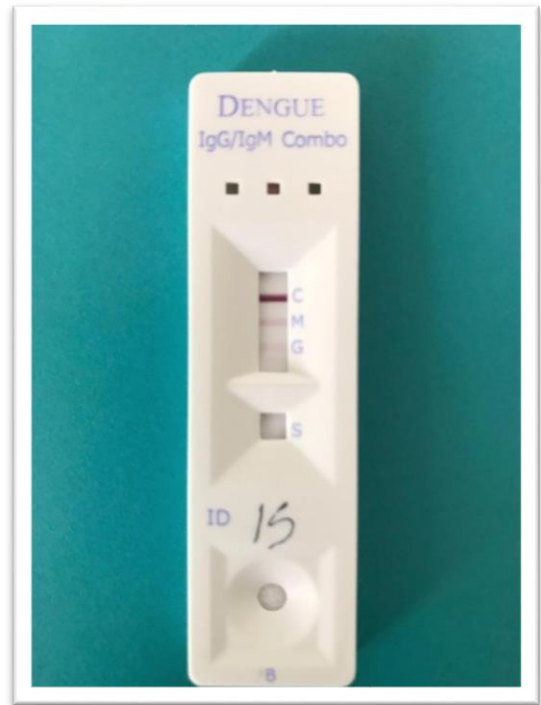
**Apéndices 4 Temperatura**

Temperatura de almacenamiento de las  
muestras (-20).



### Apéndices 5 Prueba rápida

Prueba rápida Onsite Biotech CTK  
Dengue IgG/IgM.



### Apéndices 6 Termociclador

MIC qPCR Termociclador utilizado

Para análisis de muestras por técnicas

Moleculares.

