

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SEGUNDA ESPECIALIDAD EN MEDICINA HUMANA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL DE MÉDICO ESPECIALISTA
EN MEDICINA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

EXACTITUD DIAGNÓSTICA DEL IN-Dx PARA IDENTIFICACIÓN DEL DenV,
EN PACIENTES FEBRILES

Área de investigación:

Medicina humana

Autor:

MC. RUBEN KENNY BRICEÑO DE LA CRUZ

Asesor:

Dr. ALEX NAPOLEON CASTAÑEDA SABOGAL

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5182-2640>

TRUJILLO - PERU

2020

INDICE

	PAG.
DATOS GENERALES	2
RESUMEN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	5
JUSTIFICACION DEL PROYECTO	7
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	8
MARCO TEORICO	9
HIPOTESIS	15
METODOLOGIA	17
ANALISIS ESTADISTICO	19
BIBLIOGRAFIA	20
CRONOGRAMA	25
PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO	31
ANEXOS	39

I. GENERALIDADES

1. Título:

Exactitud diagnóstica del In-Dx para identificación del DenV en pacientes febriles. Hospital Virgen de la Puerta 2021

2. Equipo Investigador:

2.1 Autor:

Ruben Kenny Briceño de la Cruz residente de tercer año del Servicio de infectología Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta.

2.2 Asesor:

Dr. Alex Napoleón Castañeda Sabogal

3. Tipo de Investigación:

De acuerdo a la orientación: Aplicada

De acuerdo a la técnica de contrastación: Explicativa

4. Área o Línea de Investigación:

Enfermedades Infecciosas y Tropicales

5. Unidad académica:

Escuela de Post Grado de la Universidad Privada Antenor Orrego

6. Institución y Localidad donde se desarrollará el Proyecto:

Localidad: Distrito de la Esperanza, Provincia de Trujillo,
Departamento de La Libertad.

Institución: Hospital De Alta Complejidad Virgen De La Puerta

1.7. Duración del Proyecto:

Fecha de Inicio: 1 de julio 2017

Fecha de Término: 30 de diciembre de 2021

II PLAN DE INVESTIGACIÓN

1. Resumen Ejecutivo del proyecto de Tesis

El proyecto busca someter la prueba diagnóstica que emplea loop mediated isothermal amplification (LAMP), para determinar la exactitud diagnóstica de la misma, El diseño será descriptivo, transversal, observacional, prospectivo, con un diseño específico que corresponderá a pruebas diagnósticas. La población será todo paciente febril con sospecha de Dengue. El tamaño muestral estará constituido por 163 pacientes. Se tomarán los datos de los pacientes incluidos en el estudio en una base construida en Microsoft Excel 2019. La exactitud diagnóstica de la prueba será determinada a través de la sensibilidad, especificidad y se obtendrán los valores de valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Se determinará la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo e intervalos de confiabilidad para evaluar su validez, reproductibilidad y seguridad en la adecuada determinación de la presencia o ausencia del virus del Dengue en las muestras. Se incluirá los intervalos confidenciales al 95%. Se usará la reacción de cadena de polimerasa como prueba de oro para el contraste con la prueba diagnóstica panel In-Dx. Todos los datos serán analizados en el programa EPIDAT 4.2.

El resultado y las conclusiones que se determinen en el presente estudio van a permitir determinar la exactitud diagnóstica del Panel In-Dx para la identificación de virus DenV. También servirá de base para futuros trabajos en nuestro hospital.

Palabras clave: LAMP, Denv

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Dengue, pertenece al grupo de enfermedades llamadas “Arbovirosis” y son enfermedades epidémicas que causan estragos en centenar de países en el mundo y tienen un rango de afectación de hasta 2.5 billones de personas que son los que potencialmente podrían verse infectados, estas enfermedades han constituido un tema de interés de salud pública para las partes involucradas, que, a pesar de sus esfuerzos, éstos se han tornado insuficientes. Las arbovirosis que causan las enfermedades del Dengue, y otros son transmitidas por mosquitos del género *Aedes Aegypti*. La literatura ha reportado cuatro serotipos para el virus DenV, los cuales tienen auge en el este de Asia, del pacífico del oeste y de Latino América y el Caribe, es por esta razón que es considerada como tropical. Nuestro país viene sufriendo sus embates principalmente en las zonas tropicales como en la región norte y nororiental como Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad, San Martín y Loreto entre otras¹

En nuestro ámbito, la región La Libertad tiene costa sierra y selva y cuenta en su geografía con muchos espacios tropicales, propicios para albergar al *Aedes Aegypti*, el vector que transmite la enfermedad al hombre como único reservorio del virus, además el vector hembra coloca sus huevos en cualquier colección de agua que le sea favorable es decir agua limpia donde deposita sus huevos que luego contribuirán a la dispersión del mosquito y la propagación de la enfermedad².

La enfermedad es diagnosticada globalmente mediante la metodología aprobada por Organización Mundial de la Salud (OMS) y estos son clínica y laboratorialmente a través de test diagnósticos, y entre los que tenemos el test de detección de anticuerpos para los virus (IgG, IgM), test Elisa para detectar la proteína no estructural NS1, los cuales son métodos indirectos de identificación de virus y por otro lado tenemos los test de detección directa del virus como son, el método de detección por reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (rtPCR). En el Perú, se usan masivamente tanto el test de Elisa como el de detección de anticuerpos, aunque son ampliamente empleadas, la exactitud para detectar la enfermedad tiene gran variabilidad y el costo supone una gran limitante. El es un método diagnóstico que utiliza la técnica Loop Mediated

Isothermal Amplification (LAMP), un método molecular de identificación viral. El Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta, es el centro referencial más grande de la Red de Salud La Libertad (RALL) y el que atiende al mayor número de pacientes por Dengue, motivo por el que se estudia el nuevo método de diagnóstico (Panel In-Dx)^{1,2}.

En la región La libertad a la semana epidemiológica 20 se reportan 1325 casos de dengue entre confirmados y de sospecha teniendo como zonas rojas a los distritos de El porvenir, Laredo, Chocope, Casa Grande y Paiján. De los casos que acuden a los centros de salud solo un porcentaje de estos acceden a diagnóstico confirmatorio por estudio de PCR y las muestras son enviadas a Lima al Instituto Nacional de Salud (INS) y luego de un periodo que varía entre 3 a 5 días se obtienen los resultados, lo que muchas veces hace demorar la decisión del manejo del paciente³.

ENUNCIADO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la exactitud diagnóstica del Panel In-Dx en la identificación del virus DenV en pacientes del Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta, 2021?

3. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Shuhua L⁴, et al (Japon 2011), en su trabajo “Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay” trabajaron con la rápida identificación y diferenciación de los flavivirus transmitidos por los mosquitos en sueros de fase aguda de los pacientes y los mosquitos del vector capturados en el campo. Desarrollaron una unidad de amplificación isotérmica (RT-LAMP) para la detección y diferenciación de los serotipos 1-4 del virus del dengue (DENV1-4), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (VNO). La unidad amplificó eficientemente los genomas virales específicamente en amplios intervalos de concentraciones de plantillas virales, y mostró curvas de amplificación similares como las monitorizadas por un motor de PCR en tiempo real. Los límites de detección de la unidad RT-LAMP fueron 100 veces superiores a los de la RT-PCR en 5 de los seis flavivirus. Los resultados sobre la especificidad indicaron

que los seis virus en el ensayo no tenían reacciones cruzadas entre sí. Al examinar 66 cepas virales de DENV1-4 y JEV, la unidad identificó los virus con una precisión del 100% y no reaccionó de forma cruzada con virus de influenza y hantavirus. Al cribar un panel de muestras que contenían sueros de 168 pacientes y 279 pocillos de sangre de mosquitos aspirados capturados en el campo, los resultados mostraron que esta unidad es altamente factible en ambientes clínicos y epidemiológicos y obtuvo resultados 100% correlacionados con RT-PCR. Concluyeron La unidad de RT-LAMP desarrollada en este estudio es capaz de detectar rápidamente y diferenciar con precisión los seis tipos de flavivirus, lo que hace extremadamente factible el cribado de estos virus en muestras de fase aguda de los pacientes y en los mosquitos vector sin la necesidad de instrumentos de alta precisión.

Boong-Teong T⁵ (India 2015) en su trabajo "Detection of Dengue Viruses Using Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification" Desarrollaron un ensayo de amplificación isotérmica (RT-LAMP) con un conjunto de nueve cebadores para la detección de los cuatro serotipos DENV y sus diferentes genotipos. Evaluaron la sensibilidad y especificidad de la RT-LAMP. Se evaluó en un total de 305 sueros de pacientes de dengue clínicamente sospechosos. Los resultados de los ensayos de RT-LAMP se compararon estadísticamente con los de los ensayos de inmunoensayo inmunoenzimático (ELISA) de transcripción inversa cuantitativa-reacción en cadena de polimerasa (qRT-PCR), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura IgM y IgG. La infección aguda por DENV tuvo una sensibilidad de 43,3% y especificidad de 46,8% con la prueba. La combinación de RT-LAMP con IgG de dengue incrementó la detección de la infección DENV aguda a 97,7% de especificidad, y sensibilidad de 70,8%. Los ensayos RT-LAMP mostraron alta concordancia ($\kappa = 0,939$) con el qRT-PCR. El ensayo de RT-LAMP detectó hasta 10 copias de ARN del virus en una hora, pero el 100% de reproducibilidad (12/12) consiguieron con 100 copias. No hubo reactividad cruzada de RT-LAMP con otros arbovirus estrechamente relacionados. Concluyeron que El ensayo RT-LAMP desarrollado en este estudio es sensible 97,7% y específico 70,8% específico. El ensayo mejoró la detección del dengue cuando se usó en combinación con métodos serológicos.

Xi L, et al⁶ (Brasil 2015) en su trabajo “Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method”, Tanto el Chikungunya como el virus del Dengue pertenecen a los virus agudos transmitidos por artrópodos. Debido a la falta de síntomas específicos, es difícil distinguir las dos infecciones basadas en las manifestaciones clínicas. Para identificar y detectar cuantitativamente los virus Chikungunya y Dengue, se desarrolló una plataforma de amplificación isotérmica (RT-LAMP) acelerada en tiempo real, con transcripción inversa, y se evaluaron 26 muestras de ARN confirmadas, 42 sospechosas y 18 muestras sanas de suero por el método. La reacción en cadena de la polimerasa-RT (PCR) y la secuenciación de cDNA se usaron como referencias. Los resultados mostraron que podría identificar el Chikungunya y Dengue virus RNA correctamente en todas las muestras de anticuerpos positivos en 1 hora, sin ninguna reacción cruzada. La carga viral de las muestras positivas se detectó cuantitativamente con un turbidímetro. La sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 95,25%. Los hallazgos indican que la RT-LAMP es método efectivo para la identificación rápida de cantidad de virus Chikungunya y Dengue en muestras de suero con operación conveniente, alta especificidad y alta sensibilidad.

Lopez-Jimena B⁷, en su trabajo “Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype”. Se desarrollaron pruebas 4 one-step transcripción reversa de amplificación isotérmica mediada por lazo, para la detección de serotipos de dengue virus (DENV) considerando 20156 genomas completos de secuencias de DENV. Pruebas de DENV1 Y DENV2 RT-LAMP fueron validadas con 31 muestras de sangre y 11 muestras de suero de Tanzania, Senegal, Sudan y Mauritania. Las pruebas de DENV3 y DENV4 RT-LAMP fueron validadas con 25 muestras de suero de Camboya. Las muestras fueron evaluadas con panel de calidad de pruebas diagnósticas externa para control de pruebas moleculares. La validación para las pruebas de DENV, con pruebas de Tanzania, resultó en 23 muestras detectadas por RT-LAMP demostrando que la prueba es 99% específica y 95.8% sensitiva, además presenta valor predictivo de 100% y un valor predictivo negativo de 85.7%, todas las otras muestras de Senegal, Sudan y Mauritania fueron detectadas y 3 muestras fueron no tipificadas. Se concluyó que con este

nuevo enfoque de diseño de primers LAMP, que hace uso de una creciente base de datos de secuenciamiento resulta en mayor eficacia de la prueba diagnóstica de DENV.

4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El “Panel (In-Dx)” para la identificación del virus DenV, se sostiene en la importancia de la identificación de casos de Dengue, que se traduce en diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de las patologías. Actualmente el esquema nacional prevención del Dengue Virus ha hecho avances en la mitigación de la enfermedad pero a pesar de sus esfuerzos estos han resultado infructuosos, es por ello que proponemos a través de este novedoso método de diagnóstico colaborar con la detección eficaz y oportuna de las personas con Dengue, cortando así la propagación de la enfermedad por contacto al ser detectados de manera oportuna en los pobladores de la región La Libertad que son atendidos en el Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta.

Cabe resaltar que la enorme carga en salud pública, que representa el Dengue, en materia económica, social, y de salud se vería tremendamente disminuida al abordar este flagelo de forma multidisciplinaria.

Se espera que con este nuevo test diagnóstico se detecte y se de tratamiento a mayor cantidad población reduciendo así las tasas de morbilidad y mortalidad que ocasiona la enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar la exactitud diagnóstica del panel “panel (In-Dx)” para identificación de DenV, en pacientes febriles

5.2. Objetivo específico

- Determinar la exactitud diagnóstica del in-dx para identificación de DenV en pacientes febriles positivos
- Determinar la exactitud diagnóstica del in-dx para identificación de DenV en pacientes febriles por reacción de cadena de polimerasa

6. MARCO TEÓRICO

El Dengue es una de las enfermedades infecciosas que constituyen las primeras causas de muerte en todo el mundo, en pacientes en edad adulta como en pacientes pediátricos, cerca de 13 millones de pacientes sucumben cada año por enfermedades transmisibles emergentes y reemergentes, entre las que tenemos tuberculosis (TBC) malaria, infección por VIH, infección por Ébola, infección por coronavirus e infección por el virus del dengue⁸.

Con este panorama, la infección por DenV es una creciente carga para salud pública en las zonas con territorio tropical. Situación similar se vive ahora en América Latina y el Caribe al igual como lo vivió el continente asiático hace más de 3 decenios, convirtiendo al dengue en la enfermedad viral vectorial, de mayor relevancia para la población en general. El vector del Dengue, el *Aedes Aegypti*, tiene su hábitat en más de un centenar de países del trópico con una población en riesgo de más de 2 billones de personas⁹.

La literatura registra que el vector del Dengue fue erradicado del país en la década del cincuenta, y reemergió en los ochentas tras lo cual la enfermedad del Dengue que alcanzo niveles de máximos de prevalencia en la década de los noventa del siglo pasado cuyo serotipo más predominante fue el 1,

principalmente en las regiones nororientales. Desde entonces la dispersión del virus ha ocurrido principalmente en el norte del país y la manifestación de los otros 4 serotipos del virus ha significado brotes en ambas locaciones donde se presenta^{9,10}.

El DenV pertenece a los arbovirus, cuyo género Flavivirus pertenece a la familia Flaviviridae entre los casi 70 patógenos virales que lo componen y agrupado debido a sus características genéticas de los cuales 30 son patogénicos¹¹.

La familia Flaviviridae son virus ARN single stranded positive sense con ciclo de replicación en células eucariotas. tiene 3 géneros: Flavivirus, virus de la hepatitis C HCV y Pestivirus. El género Flavivirus agrupa (55%) a partículas virales zoonóticas. A su vez, tiene alrededor de setenta virus agrupados en decenas¹².

El virus DenV es esférico, con un diámetro de 40 y 60 nm. Su envoltura está compuesta por la proteína E, y la proteína M, en la superficie de la partícula viral. El ARN se encuentra seguro por la nucleocápside circular de simetría poliédrica; con un diámetro nuclear de 25-30 nm. Al centro de la envoltura y la nucleocápside existe una doble capa lipídica, derivada de la membrana celular del huésped. El genoma es una sola molécula de RNA de más de 1000 bases nucleotídicas¹³.

El DenV tiene 4 serotipos: DenV 1, DenV 2, DenV 3 y DenV 4; con particularidades genéticas e inmunológicas que difieren entre sí, con gran variabilidad genética, estas expresan performances distintas en el curso de la enfermedad y su agresividad y han sido clasificadas por su procedencia geográfica¹⁴.

La partícula viral está compuesta de 6% de ARN, 66% proteica, 9% carbohidratos y 17% lípidos. El genoma cuenta con una longitud de 10000 a 13000 bases nucleotídicas, las que codifican: la proteína E de la envoltura, la proteína C de cápside y la proteína M de la membrana así también a proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5)¹⁵.

La replicación inicia cuando la proteína E facilita la penetración del virus en la célula y obedece el dogma de la genética de ingresar material genético viral en

el citoplasma de la célula del hospedador, luego las cadenas de ARN son sintetizadas para después el nuevo virión sea ensamblado y liberado¹⁶.

La heterogeneidad genotípica puede darse en el mismo paciente y esto haría suponer que distintas especies del mismo virus pueden encontrarse en el mismo hábitat, co-accionar y/o sinergia su actividad o plantear la posibilidad de recombinación genética que, de lugar a nuevas cepas del virus, como el caso de la variedad asiático americana que circula actualmente en el país con performances fenotípicas distintas y virulencias particulares, así como su patogenicidad¹⁷.

La circulación de los distintos serotipos del virus ha circulado en nuestro país desde su reintroducción en la década del noventa y geográficamente han interactuado solos o en combinación hasta la actualidad¹⁸.

Las enfermedades del dengue, es causada por la picadura de las hembras de *Aedes spp.* mosquitos infectados con el virus del dengue, contiene ARN (clasificado como agentes de Categoría "A" por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, EE.UU.) y es las enfermedades más importantes de artrópodos nacidos actualmente y afecta a más de 100 países en todo el mundo. Pone en peligro alrededor de la mitad de la población mundial, principalmente a las poblaciones urbanas en las zonas tropicales, mientras que siendo una seria amenaza para los países más templados. Para ello, los procesos de deforestación, la explosión de la población humana y el colapso de los programas de control de vectores en los países tropicales y en desarrollo, así como la enorme expansión en todo el mundo en los viajes aéreos, tienen en gran medida una contribución significativa¹⁹.

Los síntomas son altamente inespecíficos, por lo general surge después de un período de incubación de hasta dos semanas (coincidiendo con la repentina progresión de partículas virales en la sangre). Como una posible causa de la fiebre hemorrágica mortal, la enfermedad del dengue puede ocurrir en forma de cuatro serotipos virales relacionados antigénicamente (DENV1-4). Los virus del dengue tienen una cápside con tres proteínas estructurales, incluyendo una glicoproteína E-responsable de la unión a las células huésped y de reconocimiento por anticuerpos específicos. También poseen un ARN de cadena

sencilla (ssRNA) genoma, de 11 kpb y 4 kDa, con un único marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por dos regiones no traducidas en cada extremo, además de siete secuencias que codifican pro proteínas no estructurales, el más conocido es la proteína no estructural 1 (NS1). Aparte de la fiebre del dengue más común y menos peligrosa, fiebre hemorrágica del dengue (FHD) o síndrome de choque del dengue, incluso (DSS), también puede haber dos condiciones que requieren de atención médica crítica²⁰.

La inmunidad responde manera particular a la infección por el DenV, en gran parte debido a la variabilidad genómica del virus, así los productos inmunológicos de memoria tras una primo infección podrían significar desenlaces más ominosos en futuras infecciones. La fisiopatología de la severidad y la progresión de la historia natural de la enfermedad no son del todo conocidos, pero su patogenicidad podría deberse a factores tanto intrínsecos como extrínsecos del hospedador e infecciones concomitantes posibles^{21,22}.

La presencia de anticuerpos ya sea de infecciones pasadas o las vistas en lactantes de madres que han cursado con la infección fueron observados que tenían propensión a desarrollar dengue con signos de alarma con peores desenlaces y se concluyó que infecciones correlativas con diferentes genotipos del virus provocan formas graves. Se ha propuesto que la respuesta inmunológica puede crear productos subneutralizantes del virus y formar complejos patógeno anticuerpo que llevaría a respuesta erróneas y exageradas por parte del sistema inmune y los órganos diana de la replicación viral²³.

También son causas de desarrollar formas graves de la enfermedad el hecho de pertenecer a los grupos etarios extremos de la vida, enfermedades crónicas degenerativas, infecciones pasadas, la raza blanca^{24, 25}.

Las células de la inmunidad humoral asesinas naturales, en mononucleares de pacientes seropositivos, provocan mayor destrucción de células infectadas que las que no están infectadas. Y en las infecciones por segunda vez, su efecto es exponencial a la primo infección y esto es mediado por citotoxicidad celular²⁶.

La inmunidad específica mediada por linfocitos T en respuesta al virus DenV es iniciada por los linfocitos T helper CD4, en respuesta a la carga viral aumentada

en el proceso de replicación. A su vez se ha encontrado una mayor actividad de linfocitos t CD8 y de los productos inflamatorios correspondientes a su activación con cascada de citocinas, existe también participación y activación de las vías del complemento en la fisiopatología de la infección viral por DenV^{27, 28}.

Las formas severas de dengue con implicancias de alteraciones de la coagulación y extravasación capilar que comprometen la hemodinamia y las formas antiguamente hemorrágicas del Dengue, al parecer tienen componente autoinmunes y a reactividad cruzada por parte de infecciones previas y residuos de las partículas virales que han formado complejos, a su vez podrían también jugar un papel en esta condición proteínas no estructurales del virus^{29, 30}.

Algunos serotipos del virus están más relacionados con las formas más severas de la enfermedad, sobre todo los trastornos de la coagulación como variantes asiático y la combinación de la variedad asiático americana. Y en otros casos la carga viral y las condiciones del paciente parecen jugar un papel más predominante en la severidad de la enfermedad³¹.

En ausencia de vacunas o terapias aprobadas, que deben ser eficaces contra todos los cuatro serotipos, se necesitan con urgencia una tasa precisa de diagnósticos rápidos contra las formas más mortales de la enfermedad, ya que períodos febriles ya agudizados causados por infecciones de dengue, en comparación con otras causas de síndromes febriles agudas, están siendo reportados con más frecuencia. Sin embargo, el diagnóstico clínico suele ser insuficiente para la específica identificación del agente etiológico, especialmente con fines de vigilancia de enfermedades, por lo que se requiere confirmación serológica o virológicas de laboratorio. Se ha considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico de dengue convencional, al aislamiento de los virus altamente sensibles en cultivo, seguido de inmunofluorescencia microscopía empleando anticuerpos contra anticuerpos específicos de dengue, lo malo es que se requiere un equipo de alto nivel y mano de obra muy especializada y, debido a la tasa de replicación mínima de virus dengue, no es adecuada para el diagnóstico precoz^{31,32, 33}.

Aparte de los inconvenientes generales de las pruebas serológicas, algunas de ellas, se cuentan como, la inhibición de la hemaglutinación (HI) y la prueba de

neutralización, que son engorrosas, costosas y significativamente no específica. El anticuerpo monoclonal de captura-enzimoinmunoensayo (MAC-EIA) y la polimerasa con transcripción inversa-reacción en cadena (RT-PCR) han sido mayormente usados como diagnósticos laboratoriales, aunque aún tiene una baja tasa de efectividad en los países tropicales y en vías de desarrollo³⁴.

Esta Investigación propone con el Panel (In-Dx) para Dengue Virus que estas características puedan ser materializadas todas juntas en el paradigma emergente de las pruebas de punto de atención: (descentralizado) para los centros de bioanálisis, correspondiente a un análisis más cerca del paciente (en la unidad de cuidado de la salud o en casa), incluso en regiones remotas y por individuos no especializados (incluidos los usuarios finales). Con una eficacia fiable y con procesamiento de muestras de alto rendimiento en el momento oportuno, en última instancia están previstas para que actúen en todos los puntos de atención³⁵.

En el mercado peruano existen pruebas a medida, muchas de los cuales consisten en el formato de la tira de prueba ya conocida y ampliamente disponible (también llamada inmunocromatográfico o pruebas-laterales de fluencia), pueden por lo tanto ser considerados complementos valiosos de técnicas convencionales, en el banco de análisis, no sólo para permitir la detección a distancia, sino también porque permite lecturas rápidas de información lo que facilita mejorados procesos de toma de decisiones (por ejemplo, en situaciones de emergencia), así como la reducción de la cantidad de muestra en el laboratorio. Las mejoras tecnológicas en bioelectrónica han impulsado la aparición de muchas metodologías y dispositivos analíticos, como valiosos nativos ALTER para ensayos de laboratorio convencionales, para la detección rápida y precisa de los patógenos infecciosos. Muchos kits de inmunoensayo comerciales para el diagnóstico serológico de infecciones por dengue basado en MAC EIA ya están disponibles, pero por lo general requieren tiempos largos de ensayo (en el orden de algunas horas) y el procesamiento de la muestra consume mucho tiempo (incluyendo un extenso lavado e incubación pasos). Por esta razón, es difícil que sean considerados estos inmunoensayos como pruebas de diagnóstico rápido verdaderos³⁶.

7. Hipótesis

El panel In-Dx tiene una exactitud diagnóstica del 99% para identificación de DenV en pacientes febriles

8. MATERIAL Y MÉTODO:

a. Diseño del estudio

El estudio es descriptivo, transversal, observacional, prospectivo, con un diseño específico que corresponderá a pruebas diagnósticas.

b. Población muestra y muestreo

Población:

Está constituida por los pacientes febriles con sospecha de infección por los virus del Dengue atendidos en el Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta, 2020.

Tamaño de Muestra

Muestra:

Para el cálculo del tamaño muestra se usará la fórmula para el cálculo del número de sujetos en estudios de comparación de pruebas diagnósticas en una población ^{37, 38}

Tamaño de muestra para población con virus Dengue

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 S(1 - S)/i^2}{P}$$

Donde:

n= Total de sujetos a estudiar

Z_α= 1,96 representa la confiabilidad al 95%

S= 0.99 sensibilidad de la prueba 1 (In-Dx)⁷

P= 0.67 Probabilidad de que una persona tenga el virus

Dengue³⁹

I= 0.05 Precisión de la estimación

Reemplazando se tiene

$$n = \frac{1.96^2(0.923)(1 - 0.923)/0.05^2}{0.67^2}$$

$$n = 163$$

El tamaño muestra total comprenderá 163 pacientes.

Muestreo: Muestreo de corte transversal

c. Definición Operacional de Variables:

Variables	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variables	Escala de medición
Diagnóstico de identificación del virus del dengue	Arbovirus del género flavivirus	presencia de virus en muestra ausencia de virus en muestra	cualitativa nominal	nominal
Panel In-dx	Panel diagnóstico de loop mediated isothermal amplification	positivo: coloración azul del test negativo: coloración	cualitativa nominal	nominal

		violeta del test		
Reacción de cadena de polimerasa "PCR"	técnica de laboratorio para amplificación de secuencias de ADN de un patógeno	Positivo: bandas en gel de agarosa Negativo: ausencia de bandas en gel de agarosa	cualitativa nominal	nominal

d. Procedimientos y técnicas:

La técnica a utilizar será la observación y recolección de información a través de una ficha de recolección de datos en donde se registrará el código de la muestra, la edad de la participante, y si ha tenido fiebre y contacto con pacientes con síntomas sugerentes de Dengue, lugar de procedencia y otros hallazgos que pudieron haberse encontrado durante el examen físico.

Se captarán a los pacientes febriles sintomáticos con sospecha de infección por Dengue del hospital de alta complejidad virgen de la puerta, se les hará firmar el consentimiento informado para establecer de esta manera la voluntariedad por parte de el(a) paciente a participar del proyecto de investigación, posterior al consentimiento informado, se procederá a registrar la información del paciente en la ficha de recolección de datos.

A continuación, un médico capacitado tomará una muestra de Sangre periférica venosa y realizará un examen físico, luego, se procederá a tomar la muestra sanguínea al laboratorio de microbiología del hospital donde se trabajará con la muestra de acuerdo al protocolo propuesto.

- Protocolo General:
- 1. Añadir 100 μ l de agua estéril a una cónica de 50 ml.
- 2. Transferir la muestra a plato.
- 3. Transferir el espécimen de la muestra en agua 100uL a un tubo de 1.5mL
- 4. Calentar durante 15 minutos a 95°C.
- 5. Añadir 30 μ l de tampón + 30 μ l de muestra + 240 μ l de agua (300 μ l total) Para los controles +/-: añadir 30 μ l de tampón a 270 μ l de agua
- 6. Detener la reacción poniéndola brevemente en hielo o en el congelador
- 7. Leer la placa y registrarla en la hoja de cálculo

El instrumento será la ficha de recolección de datos, en la cual se registrará el código de la muestra, lugar de procedencia y si ha tenido contacto con pacientes con síntomas sugerentes de Dengue, y otros hallazgos que pudieron haberse encontrado durante el examen físico.

e. Plan de análisis de datos

Se tomarán los datos de los pacientes incluido es el estudio entre junio y julio del 2021 en el área de patología clínica de hospital de Alta Complejidad virgen de la Puerta en una base construida en Microsoft Excel 2019 y serán analizadas en el programa EPIDAT 4.2. Se usará la reacción de cadena de polimerasa como prueba de oro para el contraste con la prueba diagnóstica panel In-Dx.

La exactitud diagnóstica de la prueba será determinada a través de la sensibilidad, especificidad y se obtendrán los valores de valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, con sus correspondientes intervalos de confiabilidad para evaluar su validez, reproductibilidad y seguridad en la adecuada determinación de la presencia o ausencia del virus del Dengue en las muestras. Se incluirá los intervalos confidenciales al 95%.

f. Aspectos éticos

El presente estudio, se realizará con el permiso del comité de ética e investigación del Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta y de la escuela de postgrado de la Universidad Privada Antenor Orrego, debido a que esta será una investigación con un diseño descriptivo, observacional, que obtendrá información del resultado de las pruebas obtenidas en el servicio de patología clínica. Así mismo se recolectarán los datos en las fichas de recolección de información como se consigna en los anexos. Se considerará también la declaración de Helsinki II y las leyes generales de Salud (D.S. 2017/2006/SA y D.S 006/2007/S. A).

9. Cronograma de Trabajo

Nº	ACTIVIDADES	PERSONAS RESPONSABLES	DURACIÓN												
			N												
			JULIO 2020 - JUNIO 2021												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	Planificación y elaboración del proyecto.	INVESTIGADOR R ASESOR	X												
2	Presentación y aprobación del proyecto	INVESTIGADOR		X											
3	Recolección de Datos	INVESTIGADOR R ASESOR			X	X	X	X	X	X	X	X			
4	Procesamiento y análisis	INVESTIGADOR R ESTADÍSTICO												X	
5	Elaboración del Informe Final	INVESTIGADOR													X
DURACIÓN DEL PROYECTO			12 MESES												
PERÍODO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS POR MES															

10. Presupuesto Detallado

Naturaleza del Gasto	Descripción	Cantidad	Precio Unitario	Precio Total
Bienes				Nuevos Soles
A	Papel A5	medio millar	0.02	100.00
B	Boligrafos	4	3.00	10.00
C	plumones	03	4.00	30.00
D	paperlike	02	7.00	21.00
E	disco	1	3.00	3.00

F	Foldres	5	2.00	30.00
G	engrapadora	1	3.00	4.00
H	Grapa	2 paquete	3.00	5.00
Servicios				
I	3G	100	3.00	200.00
J	traslado	210	1.00	200.00
K	Empastados	8	12	120.00
L	copias	140	0.10	30.00
M	Asesor por Estadístico	2	250	500.00
			TOTAL	1203.00

11. BIBLIOGRAFÍAS

1. Dengue WH. Guidelines for diagnosis, Treatment. Prevention and Control. Geneva: World Health Organization. 2009.
2. Mostorino R, Rosas A, Gutiérrez V, Anaya E, Cobos M, García M. Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú-año 2001. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2002 Oct;19(4):171-80.
3. Jamanca R, Touzett A, Campos L, Jave H, Carrión M, Sánchez S. Estudio cap de dengue en los distritos de Cercado de Lima, La Victoria y San Luis. Lima, Perú. junio 2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2005 Mar;22(1):26-31.
4. Govindarajan M, Mohan R, Kaliyan V, Uaiyan M, S.L. Hoti, Benelli G, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles fabricated using *Anisomeles indica*: Mosquitocidal potential against malaria, dengue and Japanese encephalitis vectors, *Experimental Parasitology*, Volume 161, February 2016, Pages 40-47, ISSN 0014-4894, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.011>
5. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Johari J, Danlami MB, Hooi PS, Md-Esa R, AbuBakar S. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC infectious diseases*. 2015 Dec;15(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.017>.
6. Débora M.N. Luna, Karen Y.P.S. Avelino, Marli T. Cordeiro, Cesar A.S. Andrade, Maria D.L. Oliveira, Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 220, 1 December 2015, Pages 565-572, ISSN 0925-4005, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.067>.
7. Lopez-Jimena B, Bekaert M, Bakheit M, Frischmann S, Patel P, Simon-Loriere E, Lambrechts L, Duong V, Dussart P, Harold G, Fall C. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays

- for specific detection of each dengue virus serotype. PLoS neglected tropical diseases. 2018 May 29;12(5):e0006381.
8. Rigau-Perez JG, Gubler DJ, Vorndam AV, Clark GG. Dengue surveillance—United States, 1986–1992. *Morbidity and mortality weekly report*. 1994 Jul 22;43:7-19.
 9. CABEZAS S, César. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Rev. perú. med. exp. salud publica* [online]. 2005, vol.22, n.3 [citado 2016-06-23], pp. 212-228. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000300009&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1726-4634.
 10. Cobos M, Gutiérrez V, García M, Mamani E, Fernández R, Rimarachín R, Paredes T, Pérez E. Estudio serológico y virológico del brote de dengue en la Provincia de Coronel Portillo: Ucayali, Perú (2000-2001). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2004 Jul;21(3):139-45.
 11. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal of Infectious Diseases*. 2000 Jan 1;181(1):2-9.
 12. Halstead SB, O'ROURKE EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes.
 13. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):717-25
 14. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*. 1997 Aug 1;3(8):866-71.

15. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Jun 10;100(12):6986-91.
16. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Apr 7;197(7):823-9.
17. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*. 1945 Jun 22;101(2634):640-2.
18. Hayes CG, Phillips IA, Callahan JD, Griebenow WF, Hyams KC, Wu SJ, Watts DM. The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996 Oct;55(4):459-63.
19. Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, Baber L, Amador M, Thirion J, Hayes J, Seca C. Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerging infectious diseases*. 2003 Jan 1;9(1):86-9.
20. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *American journal of epidemiology*. 2002 Jul 1;156(1):40-51.
21. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC DEPT OF VIRUS RESEARCH; 1989.
22. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of biomedical science*. 2001 Sep 14;8(5):377-88.

23. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974;23(3):495-506.
24. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001 Dec 1;65(6):848-51.
25. Kanesa-Thanan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, Christ-Schmidt H, Gilson K, Zahradnik JM, Vaughn DW. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine*. 2001 Apr 30;19(23):3179-88.
26. Wichmann O, Gascon J, Schunk M, Puente S, Siikamaki H, Gjø I, Lopez-Velez R, Clerinx J, Peyrel-Hoffmann G, Sundøy A, Genton B. Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *Journal of Infectious Diseases*. 2007 Apr 15;195(8):1089-96.
27. Lee MS, Hwang KP, Chen TC, Lu PL, Chen TP. Clinical characteristics of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during the 2002 epidemic. *Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi*. 2006 Apr;39(2):121-9.
28. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *The Lancet*. 2006 Jul 8;368(9530):170-3.
29. Mammen Jr MP, Pimgate C, Koenraad CJ, Rothman AL, Aldstadt J, Nisalak A, Jarman RG, Jones JW, Srikiatkachorn A, Ypil-Butac CA, Getis A. Spatial and temporal clustering of dengue virus transmission in Thai villages. *PLoS Med*. 2008 Nov 4;5(11):e205.

30. Hotta S. Experimental studies on dengue I. Isolation, identification and modification of the virus. *Journal of Infectious Diseases*. 1952 Jan 1;90(1):1-9.
31. Peeling, R., Artsob, H., Pelegrino, J. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* **8**, S30–S37 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>.
32. Velasco MV, Martinez VA, Roiz J, Huazano F, Nieves A. Muestreo y Tamaño de muestra. El Cid Editor. Mexico. 2002.
33. Cheng X, Chen G, Rodriguez WR. Micro-and nanotechnology for viral detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009 Jan 1;393(2):487-501.
34. Oliveira MD, Nogueira ML, Correia MT, Coelho LC, Andrade CA. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011 Jul 20;155(2):789-95.
35. Muller DA, Corrie SR, Coffey J, Young PR, Kendall MA. Surface modified microprojection arrays for the selective extraction of the dengue virus NS1 protein as a marker for disease. *Analytical chemistry*. 2012 Mar 12;84(7):3262-8.
36. Guzman MG, Harris E. Dengue. *The Lancet*. 2015 Feb 6;385(9966):453-65.
37. Zhang B, Salieb-Beugelaar GB, Nigo MM, Weidmann M, Hunziker P. Diagnosing dengue virus infection—rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015 Oct 31;11(7):1745-61.
38. Cheng X, Chen G, Rodriguez WR. Micro-and nanotechnology for viral detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009 Jan 1;393(2):487-501.
39. Morrison AC, Minnick SL, Rocha C, Forshey BM, Stoddard ST, Getis A, Focks DA, Russell KL, Olson JG, Blair PJ, Watts DM. Epidemiology of

dengue virus in Iquitos, Peru 1999 to 2005: interepidemic and epidemic patterns of transmission. PLoS neglected tropical diseases. 2010 May 4;4(5):e670.

40. Rodríguez VMV, O VAM, Hernández JR, G FH, R AN. Muestreo y tamaño de la muestra: una guía práctica para personal de salud que realiza investigación [Internet]. El Cid Editor; 2003. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=3H3RMgEACAAJ>

41. Marines Steinmetz, Dhésmon Lima, Adriano Gonçalves Viana, Sérgio Toshio Fujiwara, Christiana Andrade Pessôa, Rafael Mazer Etto, Karen Wohnrath, A sensitive label-free impedimetric DNA biosensor based on silsesquioxane-functionalized gold nanoparticles for Zika Virus detection, Biosensors and Bioelectronics, Volume 141, 2019, 111351, ISSN 0956-5663

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111351>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566319304300>)

42. Satoshi Kutsuna, Sho Saito, Norio Ohmagari, Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, Journal of Infection and Chemotherapy, Volume 26, Issue 12, 2020, Pages 1249-1253, ISSN 1341-321X

<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.07.001>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X20302142>)