

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



***“FACTORES GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS EN EL HUÉSPED ASOCIADOS
CON DENGUE EN TEGUCIGALPA, HONDURAS”***

TESIS SUSTENTADA POR:

CYNTHIA MARILHYN RODRÍGUEZ GALO

PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

TEGUCIGALPA M.D.C. 27 DE MARZO DEL 2012 HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

Licda. JULIETA CASTELLANOS

VICERRECTORA ACADÉMICA

Dra. RUTILIA CALDERON

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

OLGA MARINA JOYA, Ph.D.

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

MIRNA MARÍN, Ph.D.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRON, M.PH.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

IVETTE LORENZANA DE RIVERA, M.Sc.

TERNA EXAMINADORA:

IVETTE LORENZANA DE RIVERA, M.Sc.

WENDY MURILLO, Ph. D.

JORGE CARRASCO, Ph. D.

Dedicatoria

A Dios primeramente, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y las facultades para terminar este posgrado y que sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A mi asesora, la Dra. Ivette Lorenzana, quien ha sabido guiarme por este camino a sortear con éxito las vicisitudes de la vida profesional y por su valiosa compañía en el desarrollo de esta investigación y tesis.

A mi esposo, Norlan Briceño, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante. Su comprensión y paciente espera para que pudiera terminar el posgrado son evidencia de su gran amor.

A mi adorado hijo Ariel André quien me prestó el tiempo que le pertenecía para terminar mis estudios, mi motivación constante para seguir adelante.

A mi Mami Fredesvinda Galo quien me enseñó desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas. Mi triunfo es el tuyo!

A mi hermana Nancy, quien con su cariño a cuidado a mi hijo como suyo! A mi familia toda!

Agradecimientos

Al proyecto Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 “Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”

A los investigadores principales y fundadores de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Dra. Ana Sánchez, Dra. Maritza Canales y Dra. Lourdes de Madrid, que me dieron esta oportunidad y quienes me han apoyado en la trayectoria de la misma.

A las integrantes de la sección de Virología de la Escuela de Microbiología, quienes me han apoyado constantemente, mis compañeros de lucha: Wendy Murillo, Leda Parham, Gloria Salinas y Olga Chirinos.

A mis compañeros de la Maestría, quienes siempre me animaron cada vez que lo necesitaba, mi compañía en los buenos y malos momentos: Jafet, David, Carmen, María Mercedes, Lilian, Suyapa, Jessy y María Concepción, a todos Gracias!

Contenido

Dedicatoria	i
Agradecimientos.....	ii
Contenido	iii
Glosario	v
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros.....	viii
Lista de Apéndices	viii
Capítulo 1. Introducción	1
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos	5
Capítulo 2. Marco Teórico.....	6
2. 1. Historia del dengue.....	6
2. 2. Epidemiología del dengue	6
2. 3. Agente etiológico	8
2. 4. Características del Vector.....	10
2. 5. Ciclo de transmisión del virus del dengue	13
2. 6. Manifestaciones clínicas del dengue	14
2. 7. Clasificación del dengue	16
2. 8. Patogenia del dengue.....	18
2. 9. Inmunopatogenia.....	19
2. 10. Determinantes genéticos asociados al Dengue	20
2. 11. Diagnóstico del dengue.....	23
2. 12. Prevención y Control	26
Capítulo 3. Metodología	27
3. 1. Diseño del estudio	27
3. 2. Tamaño de muestra	27
3. 3. Criterios de inclusión y exclusión	27
3. 4. Toma de muestras.....	28

3. 5. Análisis de las muestras	29
3. 6 Análisis de datos.....	42
3. 7 Condiciones de bioseguridad	42
3. 8 Consideraciones Éticas.....	42
Capitulo 4. Resultados	44
4. 1. Generalidades de la población en estudio	44
4. 2. Clasificación de la infección por Dengue.....	45
4. 3. Determinación de los polimorfismos con la plataforma del SEQUENOM ¡PLEX assay process.....	46
4. 4. Determinación de los polimorfismos por PCR-RFLP.....	48
Capitulo 5. Discusión.....	52
Capitulo 6. Conclusiones	55
Capitulo 7. Recomendaciones.....	56
Capitulo 8. Referencias	57
Apéndices	63

Glosario

Alelo: variante de un gen polimorfo en un locus genético dado.

DC-SIGN: (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin) es una lectina de tipo C; receptores de unión a antígenos en células dendríticas.

Haplotipo: conjunto de variantes alélicas presentes en determinada región genética.

Heterotípico: Del griego eteros, otro y typos, tipo; de diferente tipo o forma.

HLA (human leukocyte antigen), antígeno leucocitario humano; llamado así al complejo mayor de histocompatibilidad en humanos. Conjunto de moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico, éstas actúan como receptores para el antígeno y presentan los péptidos derivados del antígeno a los linfocitos T.

Polimorfismos: variación en la secuencia genómica de un determinado gen.

Receptor Fc: receptores de la superficie celular que se unen a la porción Fc de las inmunoglobulinas.

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADA: amplificación dependiente de anticuerpos.

ARN: ácido ribonucleico

C: complemento, ejemplo, C3a, C5a.

DC: dengue clásico

DH: dengue hemorrágico

dNTP: desoxinucleotido trifosfato

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina. Esta puede ser de tipo A, D, G, o M.

ELISA: (enzyme-linked immunosorbent assay), ensayo enzimático inmunoabsorbente.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: factor activador de plaquetas.

RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa.

SCD: síndrome de choque por Dengue

SNP: (single nucleotide polymorphism) Polimorfismo de nucleótido simple

TNF: factor de necrosis tumoral.

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Genoma del virus dengue	09
Figura 2	Ciclo de replicación del virus dengue	10
Figura 3	Áreas en riesgo de transmisión de dengue	12
Figura 4	Ciclo de vida del <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 5	Ciclo de transmisión del virus dengue	14
Figura 6	Diagrama de clasificación del dengue	16
Figura 7	Flujo-grama de trabajo de la metodología	43
Figura 8	Distribución de la infección por grupo etario	46
Figura 9	Distribución de la infecciones 1rias y 2rias	47
Figura 10	Polimorfismo de la variante DC-SIGN1-336	51
Figura 11	Polimorfismos en el receptor FcγRIIA-131	52
Figura 12	Polimorfismos en el receptor de vitamina D-352	53

Lista de cuadros

		Página
Cuadro 1	Serotipos aislados de dengue en Honduras	08
Cuadro 2	Manifestaciones clínicas del dengue	16
Cuadro 3	Clasificación de las infecciones en casos y controles	47
Cuadro 4	Frecuencia de los polimorfismos en los genotipos Analizados por MassArrays	49
Cuadro 5	Pesos moleculares esperados en DC-SIGN1-336	50
Cuadro 6	Pesos moleculares esperados en FcγRIIA-131	52
Cuadro 7	Pesos moleculares esperados en VDR-352	53

Lista de Apéndices

- A. Ficha epidemiológica del dengue
- B. Carta de Invitación para participar en el estudio de investigación
- C. Consentimiento informado para participar como voluntario en el estudio de investigación
- D. Consentimiento informado para los padres o guardianes
- E. Aprobación de Ética del Estudio.

Capítulo 1. Introducción

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor importancia en salud pública a nivel mundial. Se conocen cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) siendo su principal vector el *Aedes aegypti*, ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales, predominando en áreas urbanas y semi-urbanas. Aproximadamente 2.5 billones de personas están en riesgo de contraer la infección con los virus dengue. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que se reportan más de 50 millones de casos anuales de dengue, que puede presentarse desde una forma asintomática a una enfermedad febril de inicio brusco pudiéndose producir formas más severas como el Dengue Hemorrágico (DH) o el Síndrome de Choque por Dengue (SCD); anualmente, ocurren cerca de 500,000 casos de DH, potencialmente fatales [WHO, 2009c]. Para el año 2001, en América se reporta una prevalencia de infecciones por dengue de 2.4%; para el año 2007, la prevalencia reportada fue 2.9% [WHO, 2009a], por lo que claramente se observa que la enfermedad ha ido en aumento. En Honduras, ha existido una actividad epidémica intensa desde el inicio de su reporte en 1978 [Figueroa, 1999; Figueroa et al., 1982] de las cuales las más significativas fueron en los años 2002, 2007 y 2010, este último año posicionándose como la más grande ocurrida hasta la fecha, en donde se observó la co-circulación de los 4 serotipos del dengue. Un rápido aumento de la población urbana ha hecho cada vez mayor el número de personas en contacto con el vector [Wilder-Smith and Gubler, 2008], sobre todo en las zonas que son favorables para el aumento de la densidad poblacional de los mosquitos, por ejemplo, hogares donde es común el almacenamiento de agua, donde los servicios potables públicos son insuficientes y el saneamiento ambiental es deficiente.

Existen otros factores que favorecen la incidencia cada vez mayor del dengue, la virulencia del virus [Rosen, 1977], así como la respuesta inmune pre-existente del huésped, entre otros. La patogénesis central del DH, es la pérdida de la integridad endotelial, Halstead y colaboradores reportaron que en las infecciones secundarias se aumenta el riesgo a padecer las formas severas de dengue por una respuesta inmune aumentada (heterotípica) contra otro serotipo [Halstead, 1979], conocida como la Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA). Sin embargo, esta teoría no puede explicar totalmente la ocurrencia de DH, en primer lugar no todos los casos de DH/SCD ocurren en el contexto de infecciones secundarias, aún en zonas endémicas donde hay mayor probabilidad de que infecciones secundarias ocurran con alta frecuencia, solo ocurren un porcentaje mínimo de formas severas. Otros factores deben intervenir y contribuir a la patogénesis de DH/SCD.

Investigaciones recientes han analizado los polimorfismos genéticos asociados a varias patologías, entre ellas el dengue, estos polimorfismos son variaciones menores en los genes que usualmente tienen un efecto en la regulación y función de las proteínas, éstos cambios sutiles pueden tener consecuencias muy importantes en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas [Cooke and Hill, 2001]. Ha sido demostrado en varios estudios que los factores genéticos juegan un rol importante en la respuesta a las infecciones con el virus dengue, un estudio realizado en Cuba demuestra una mayor tendencia a padecer DH en individuos de la raza blanca, donde se reporta que el riesgo es 2.6 veces mayor en dicho grupo racial comparado con individuos de raza negra [Sierra et al., 2007b].

También se ha demostrado que algunas mutaciones puntuales (polimorfismos) de los genes del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) clase I (A31y B15), en individuos

Cubanos, están significativamente asociadas a la susceptibilidad de padecer DH, en cambio genes del HLA clase II (DRB1-4 y 7) han sido asociados a protección a la enfermedad [Sierra et al., 2007a]. Similarmente en individuos Mexicanos se observó que el polimorfismo en HLA (DRB1-4) fue asociado como factor protector al desarrollo de DH [LaFleur et al., 2002]. Estudios en Tailandeses, en el gen CD209, que codifica para DC-SIGN1-336 (receptor presente en células dendríticas), revelaron que formas polimórficas en el alelo G, (genotipos GG y GA) tienen mayor predisposición a padecer DH [Sakuntabhai et al., 2005]. En un estudio realizado en niños vietnamitas se observó que las formas alélicas C (t) en la posición 352 en el gen del receptor de la vitamina D, se asocia con protección a formas severas del dengue. Adicionalmente, en el mismo estudio se encontró evidencia de un posible efecto protector para DH en homocigotos (RR) de la variante Arginina en la posición 131 del gen del receptor FcγRIIA [Loke et al., 2002].

El receptor DC-SIGN juega un papel importante en el reconocimiento y entrada del virus a las células dendríticas [Boily-Larouche et al., 2007]; se conoce que las células dendríticas son susceptibles a la infección en la ruta de entrada del virus [Marovich et al., 2001], existen reportes sobre asociaciones entre polimorfismos en este receptor con dengue [Tassaneetrithep et al., 2003], con el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [Selvaraj et al., 2009] y con la tuberculosis [Olesen et al., 2007] entre otros. **El receptor FcγRIIA** tiene un rol importante en la modulación de la respuesta inmune; polimorfismos en este receptor han sido asociados a la severidad de la enfermedad meningocócica [Platonov et al., 1998], y con dengue [Loke et al., 2002]. **El receptor de vitamina D** posee un efecto inmuno-regulatorio que incluye la activación de monocitos, estimulación de la respuesta inmune celular, supresión de la producción de

inmunoglobulinas y proliferación de linfocitos [MacDonald et al., 1994], polimorfismos en éste receptor han sido asociados a hepatitis B y con tuberculosis [Bellamy et al., 1999; Huang et al., 2010] así como con dengue [Loke et al., 2002].

Sabiendo que factores del virus, del vector y del hospedero intervienen en estos escenarios, en el presente estudio, se analizó la asociación de factores genéticos e inmunológicos en el huésped con dengue clásico y dengue hemorrágico en Tegucigalpa, Honduras, mediante el uso de tres diferentes polimorfismos localizados: receptor de células dendríticas (DC-SIGN1-336), receptor de baja afinidad Fc γ RIIA (R/H131), receptor de la vitamina D (VDR-352), y la caracterización de infecciones primarias y secundarias por medio del estudio del perfil inmunológico en individuos clasificados de haber padecido DH y DC. Otro objetivo del estudio fue realizar una comparación de la técnica Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, conocido como RFLP por sus siglas en inglés (Restriction Fragment Length Polymorphism), con la técnica de genotipificación por medio de la tecnología de MassArrays [Lopez et al., 2002] para estudios de amplia asociación genómica basados en polimorfismos de nucleótido simple (single nucleotide polymorphism o SNPs) utilizando el SEQUENOM iPLEX Assay Process (Sequenom ® Inc. EE.UU)

Objetivo general

Asociar factores genéticos e inmunológicos en el huésped con dengue en Tegucigalpa, Honduras

Objetivos específicos

1. Clasificar las infecciones primarias y secundarias a través del perfil inmunológico, en pacientes con dengue clásico y dengue hemorrágico.
2. Investigar la asociación de las variantes genéticas en el hospedero, de los receptores: DC-SIGN 1-336, Fc γ RIIA (H/R131) y el de la vitamina D (352), con el dengue clásico y dengue hemorrágico.
3. Comparar la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con la tecnología de genotipificación por la tecnología de MassArrays por iPLEX con la plataforma del SEQUENOM.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1 Historia del dengue

El término “dengue” se dio a conocer en América entre 1827 y 1828, a raíz de una epidemia en el Caribe que producía fiebre, artralgias y exantema. Los esclavos provenientes de África identificaron a esta entidad patológica como *dinga* o *dyenga*, equivalente del *Swahili Ki denga pepo*, que significa ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un “espíritu malo” [Vasilakis and Weaver, 2008].

En América, los relatos sobre esta dolencia datan de más de 200 años; la primera epidemia de dengue clásico de las Américas estaba relacionada con el serotipo DEN-3 y, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela en 1963-64. Anteriormente había sido aislado el DEN-2 en Trinidad en 1953-54 a partir de casos no epidémicos. En 1977 el serotipo DEN-1 fue introducido en Jamaica, diseminándose por la mayoría de las islas del Caribe y Centro América causando epidemias. Para 1982 el serotipo DEN-4 junto con el DEN-1 causaron una epidemia en Brasil [OPS, 1995], y desde entonces los cuatro serotipos del dengue han sido transmitidos simultáneamente en muchos países de las Américas donde circula el *Aedes aegypti*.

2.2 Epidemiología del dengue

El Dengue es endémico en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, predominando en áreas urbanas y semi-urbanas. Dos quintos de la población mundial están en riesgo de contraer el dengue. Cada año se producen unas 500,000 hospitalizaciones por DH, y una gran proporción de esos pacientes son niños. Aproximadamente un 2.5% de los afectados mueren, y sin el manejo clínico adecuado, las tasas de letalidad del DH pueden superar el 20% [WHO, 2009b].

Con la re-infestación de muchos países en la región de las Américas por el *Aedes aegypti*, y con la aparición de un vector secundario, el *Aedes albopictus*, las epidemias de dengue se han incrementado significativamente [Gubler and Trent, 1993] con circulación simultánea de los cuatro serotipos, y con re-aparición de alguno de los serotipos de tiempo en tiempo, lo cual usualmente se asocia con brotes epidémicos significativos.

En Honduras el año 2002, hubo un número reportado de 32,269 casos de dengue clásico (DC) con una tasa de incidencia acumulada de 491 por 100,000 habitantes; y con 668 casos confirmados de DH con 17 muertes (tasa de fatalidad de 1.96%). En el año 2007 hubo de nuevo un brote de gran magnitud con 29,328 casos de DC en todo el país, con una incidencia de 400 por 100,000 habitantes, reportándose 1,692 casos de DH y 15 muertes. Del año 2007 al 2010, se ha registrado un incremento en el número de casos de DC y DH, aumentado la tasa de fatalidad en Honduras del 1 al 3%. Para el año 2010, la Secretaria de Salud Pública reportó 66,814 casos de DC, 3,226 casos de DH y 83 muertes, la epidemia más grande que ha ocurrido hasta ahora. En Honduras han circulado los cuatro serotipos del dengue, en 1998 se reportaron los serotipos 2 y 3, a partir de 2004 los serotipos 1 y 4. Los serotipos 2 y 3 se han asociado en otros países con mayor morbilidad [Fried et al., 2010; Vaughn et al., 2000].

De acuerdo a los reportes de la Secretaria de Salud en Honduras, se ha confirmado la circulación en el país de los cuatro serotipos de dengue, como se muestra en el cuadro 1.

<i>Años</i>	<i>Casos Captados de Dengue Clásico</i>	<i>Casos Confirmados Dengue Hemorrágico</i>	<i>Serotipo Aislado</i>
1998	21,359	75	DEN 2 Y 3
1999	17,999	63 (8 Muertes)	DEN 2 y 3
2000	13,741	314 (10 Muertes)	DEN 2
2001	9,181	155 (9 Muertes)	DEN 2
2002	32,269	863 (17 Muertes)	DEN 2 y 3
2003	16,559	467 (17 Muertes)	DEN 2
2004	19,971	351 (8 Muertes)	DEN 1, 2 y 4
2005	18,843	254 (9 Muertes)	DEN 1,2 y 4
2006	7,800	172 (6 Muertes)	DEN 2 y 4
2007	29,328	1,692 (15 Muertes)	DEN 2 Y 4
2008	16,460	399 (9 Muertes)	DEN 2 y 4
2009	14,528	777 (17 Muertes)	DEN 1 y 2
2010	66,814	3,266 (83 Muertes)	DEN 1,2,3 y 4
2011*	4,704	35 (0 Muertes)	DEN-2

Cuadro 1: Serotipos aislados de dengue en Honduras (*hasta la semana epidemiológica No. 34).

2.3 Agente etiológico

2.3.1 Estructura del virus

El virus dengue es un virus ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, envuelto, con un genoma de aproximadamente 11 kilo-bases y de alta variabilidad genómica que ha sido completamente secuenciado. Pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus. Existen 4 serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) que comparten homología de secuencia del 70% aproximadamente. El genoma viral está compuesto de un solo “Marco de Lectura Abierto”(ORF), flanqueado por 2 Regiones No Transcritas (NTR) 5’ y 3’; el genoma codifica para tres proteínas estructurales del virus (figura 1), la cápside (C) que rodea y protege al ácido nucleico; la proteína de membrana (M) implicada en la reorganización de la estructura de la superficie viral; y la proteína de envoltura (E) responsable de la interacción con las células hospederas; además posee siete proteínas no

estructurales (NS), dentro de las cuales se encuentran la proteína NS1 que participa en la maduración y replicación viral [Lindenbach and Rice, 2003], la proteína NS3 que tiene función de helicasa y proteasa [Xu et al., 2005] y la proteína NS5 asociada a la función polimerasa del virus [Acosta Bas and Gomez-Cordero, 2005].

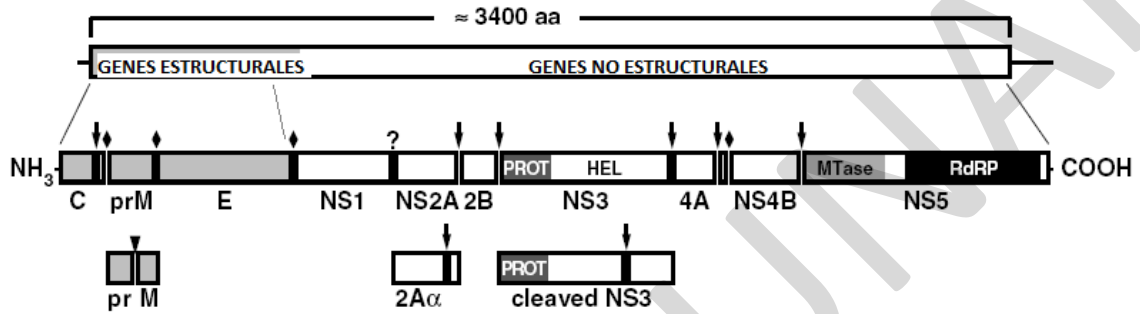


Figura 1. Genoma del virus dengue. Tomada de Lindenbach & Rice, 2003.

2.3.2 Ciclo de replicación

El virus dengue entra en la célula por endocitosis mediada por receptores. La envoltura del virus se funde con la membrana del endosoma. Al acidificarse el medio de la vesícula endosómica, se libera la nucleocápside en el citoplasma. Poseen un ARN de polaridad positiva que funciona como ARN mensajero que se traduce directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación, fabricándose las proteínas estructurales y no estructurales.

La proteína C (cápside) se traduce primero exponiendo el lugar de escisión sobre el que actuará una proteasa, y luego un péptido señalizador para la asociación con el retículo endoplásmico. La glicoproteína E se sintetiza más adelante, se glucosila, se procesa en el aparato de golgi y se transfiere a la membrana plasmática. Las proteínas de la cápside se

ensamblan en la región de las membrana plasmática que contiene la proteína E, y el virus se libera por exocitosis de la célula hospedera [Clyde et al., 2006]

Ciclo de replicación del virus del dengue. 1) el virus se une a la célula huésped, 2) interactúa con su complejo receptor, 3) entra a través de las vesículas, 4 y 5) se lleva a cabo la fusión y la liberación del ARN viral, 6) el ARN es traducido en el citoplasma, 7) la poli proteína es procesada por proteasas virales y celulares, 8) posteriormente el ARN es replicado, 9) las cadenas de polaridad positiva son encapsidadas, 10) las membranas se cubren, 11 y 12) se liberan por vía exocitica después del procedimiento de la proteína viral prM a M.

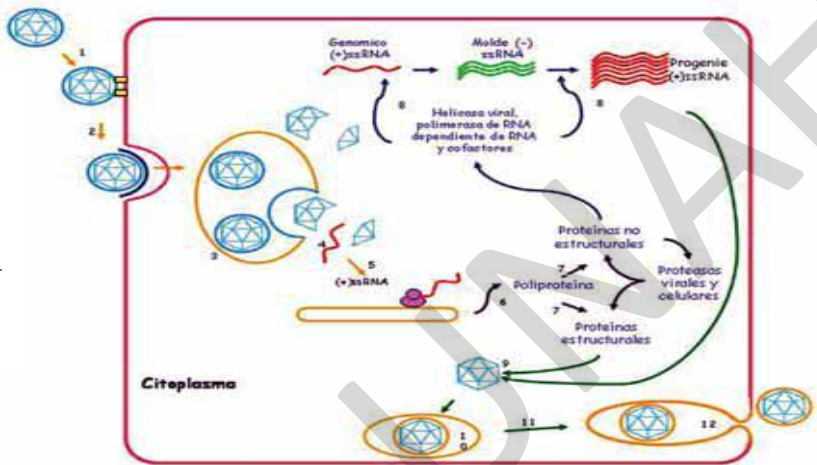


Figura 2. Ciclo de replicación del virus dengue. Tomado de Del Ángel, 2006

2.4 Características del Vector

2.4.1 Taxonomía

El Dengue es transmitido principalmente por mosquitos hembras hematófagas de *Aedes aegypti*, y otro vector secundario, menos eficiente el *Aedes albopictus* [Lambrechts et al., 2010]. El mosquito *A. aegypti* pertenece al Phylum: *Artrópoda*, clase: *Insecta*, orden: *Diptera*, suborden: *Nematóceras*, familia: *Culicidae*, tribu o subfamilia: *Culicini*, género: *Aedes*, subgénero: *Stegomyia*, grupo: "A", especie: *aegypti* [Mattingly, 1967]. El *A. albopictus* pertenece también al subgénero *Stegomyia*, pero está comprendido en el grupo *Scutellaris* y la especie *albopictus*.

2.4.2 Distribución

El *A. aegypti* tiene una distribución muy amplia y estable entre los trópicos y zonas subtropicales (figura 3); tiene además, una preferencia doméstica en su ciclo de vida, por lo que su adaptabilidad es muy amplia hacia los diferentes escenarios en los que habita el hombre. Se encuentra difundido en áreas con características urbanas, aunque también se puede encontrar en áreas rurales. El *A. albopictus*, es un vector importante en el sudeste asiático, se distribuye desde Japón, Corea, y las islas del Pacífico del Sur de Asia, hasta algunos países europeos, formando un corredor continental e insular. El *A. albopictus* se ha extendido a América, reportándose su presencia desde 1946 en los Estados Unidos de América[Rigau-Perez et al., 1994]. En Honduras el principal vector del virus dengue es el *A. aegypti*, sin embargo se ha encontrado la presencia de *A. albopictus* en diferentes regiones del país desde el 2003 (reportes del Programa Nacional de Dengue, Secretaria de Salud Pública, Honduras).



Figura 3: Áreas en riesgo de transmisión de dengue 2008. Tomado de WHO, 2009.

2.4.3 Ciclo de vida

Los mosquitos *Aedes* tienen dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: una fase acuática o de estadios inmaduros y la fase aérea o de adulto; en la fase acuática existen tres formas evolutivas distintas: huevo, larva y pupa (Figura 4). La fase aérea o de adulto corresponde al mosquito o zancudo. El período acuático tiene una duración promedio de siete a diez días, pero puede prolongarse a más del doble de tiempo, cuando la temperatura disminuye o los alimentos son escasos, o bien reducirse hasta cinco días cuando hay alimento y la temperatura oscila entre los 25 y 34 °C. El alimento natural del *A. aegypti* hembra es la sangre de mamíferos, roedores y aves, la cual necesita para lograr la maduración de sus huevecillos, también se alimenta de néctares de las plantas que se encuentran en el hábitat doméstico; prefiere realizar sus actividades alrededor del hombre (antropofílico) y alimentarse de su sangre (antropófaga). El *A. aegypti* en condiciones naturales sobrevive entre 15 y 30 días, alimentándose aproximadamente cada tres días, de preferencia en las horas de la mañana, la hembra de *A. aegypti* puede volar en un radio promedio de 40 a 60 metros y no más de 100 metros [Córdova et al., 2007] y todas las personas que se encuentren a esa distancia podrían estar expuestos a su picadura.

El *A. aegypti* se reproduce en cualquier recipiente utilizado para el almacenamiento de agua, así como en envases de plástico desechado, llantas y en cualquier otro objeto que acumule agua de lluvia, incluso se reproduce ampliamente en hábitats naturales como los agujeros de los árboles o las hojas. El *Aedes albopictus*, es conocido como “mosquito tigre asiático” y es una especie propia de la selva, que se ha adaptado a los ambientes

rurales y urbanos. A diferencia de *A. aegypti*, su radio de vuelo puede alcanzar los 500 metros.

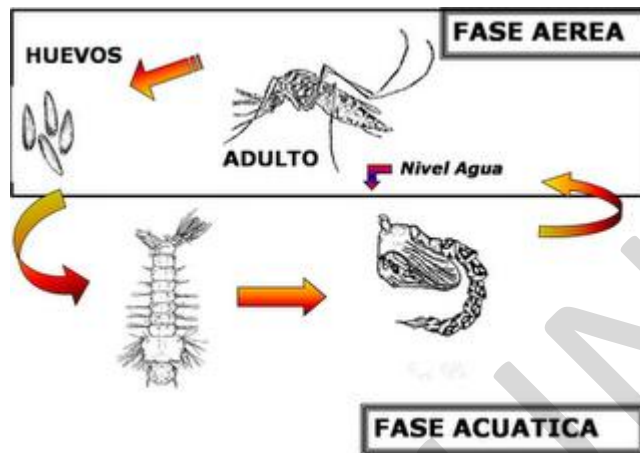


Figura 4: Ciclo de vida del *Aedes aegypti*. Tomada de <http://3.bp.blogspot.com>

2.5 Ciclo de transmisión del virus del dengue

El ciclo de transmisión del virus dengue por el mosquito o zancudo comienza con una persona infectada con el virus. Esta persona tendrá el virus circulando en la sangre, una viremia que dura aproximadamente cinco días. Durante el período virémico, un mosquito hembra pica a la persona e ingiere sangre que contiene al virus. En el mosquito el virus se replica en el intestino medio y atraviesa la lámina basal del intestino para alcanzar otros tejidos secundarios e infectar las células de las glándulas salivales alrededor del tercer día después de la infección; el mosquito permanece infectado durante el resto de su vida. A continuación, el mosquito infectado se alimenta de otra persona y le transmite el virus, el cual se replica en la segunda persona, en el que se pueden producir síntomas asociados con la enfermedad del dengue. Los síntomas aparecen en un promedio de cuatro a siete días (período de incubación) después de la picadura de mosquito. La viremia comienza

antes de la aparición de los síntomas. Los síntomas causados por la infección con el virus del dengue pueden durar de tres a diez días, con un promedio de cinco días.

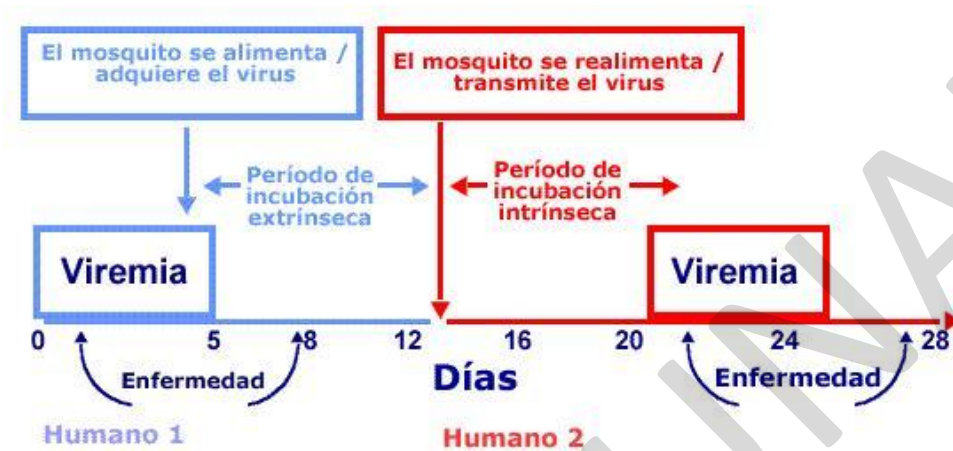


Figura 5: Ciclo de transmisión del dengue. Tomada de www.diariodeciencias.com.ar

2.6 Manifestaciones clínicas del dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica y dinámica [(OPS), 2010], puede cursar en forma asintomática hasta formas graves. Después de un periodo de incubación la enfermedad pasa por tres fases: febril, crítica y de recuperación.

2.6.1 Fase febril

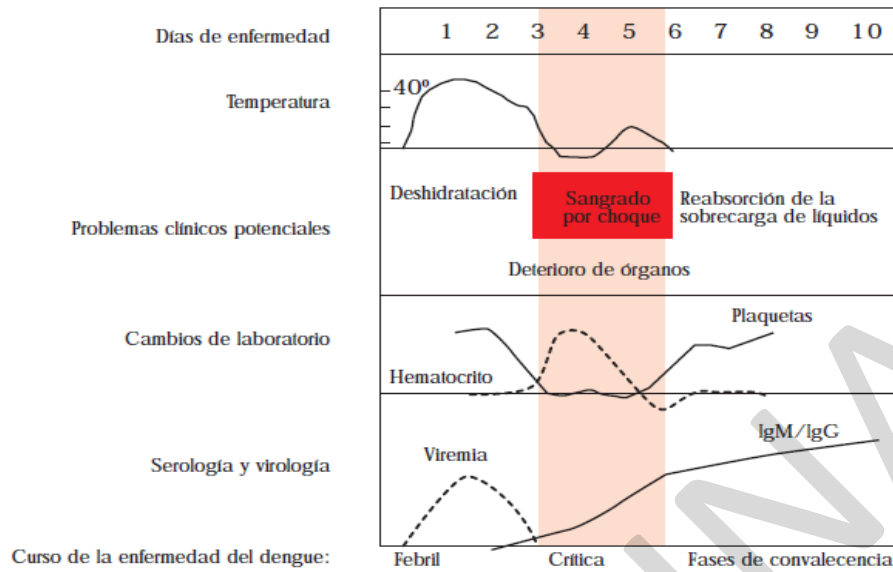
Esta comienza bruscamente con fiebre que puede durar de 2-7 días, puede acompañarse de cefalea intensa, mialgias, artralgias y dolor en los ojos (retro-ocular), puede presentarse enrojecimiento facial, eritema y dolor corporal generalizado. Algunos pacientes pueden presentar anorexia, náuseas y vómito. Pueden presentarse hemorragias menores como petequias y equimosis en la piel.

2.6.2 Fase crítica

Cerca de la desaparición de la fiebre (ver cuadro 2) cuando la temperatura desciende a 37.5 grados Celsius por lo general en los primeros 3-7 días de la enfermedad puede aumentar la permeabilidad capilar, paralelamente con los niveles del hematocrito esto marca el comienzo de la fase crítica, el periodo de extravasación de plasma dura de 24-48 horas. Puede asociarse con hemorragia en la mucosa nasal y de encías así como sangrado vaginal aumentado. La leucopenia y linfocitosis con 15-20% de formas atípicas, seguida de una rápida disminución del recuento de plaquetas suele preceder a la extravasación del plasma. Los pacientes sin un aumento de la permeabilidad vascular mejoran y por el contrario aquellos con mayor permeabilidad empeoran. El derrame pleural y la ascitis pueden ser clínicamente detectables en función del grado de pérdida del plasma. El choque ocurre cuando un volumen crítico de plasma se pierde por extravasación. Esto compromete varios órganos como el pulmón, hígado, corazón, riñón y el intestino entre otros.

2.6.3 Fase de recuperación

Cuando el paciente sobrevive a la fase crítica que no excede las 48-72 horas pasa a la fase de recuperación, dándose a lugar una reabsorción gradual de líquido extravasado, el cual regresa al compartimiento intravascular. Se observa una mejora en el estado general, algunas veces puede presentarse una erupción en forma de “islas blancas en un mar rojo”.



Cuadro 2: Manifestaciones clínicas del dengue tomada de: Dengue Guidelines for Diagnosis Treatment, Prevention and Control OPS, 2009.

2.7 Clasificación del dengue

Como se muestra en la figura 6, la clasificación recomendada por la organización mundial de la salud en el 2009 es la llamada clasificación revisada [(OPS), 2010], la cual establece dos formas de la enfermedad: dengue y dengue grave o severo. Dicha clasificación se hizo con el fin de mejorar el reconocimiento de la enfermedad, decidir conductas terapéuticas y prevenir en lo posible el dengue grave.

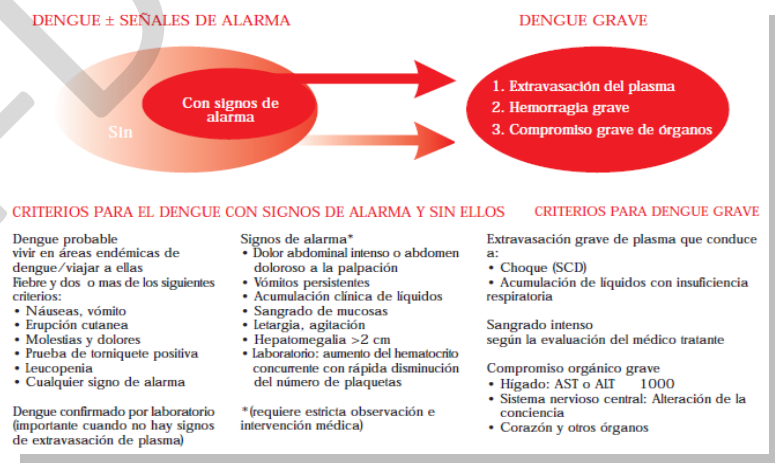


Figura 6: Diagrama de clasificación del dengue, tomada de: Dengue Guidelines for Diagnosis Treatment, Prevention and Control OPS, 2009.

2.7.1 **Dengue sin signos de alarma:** esta descripción es congruente con la fase febril descrita anteriormente, en la que puede presentar uno o varios síntomas no más de una semana generalmente, para luego pasar a una etapa convaleciente.

2.7.2 **Dengue con signos de alarma:** después de bajar la fiebre, el paciente puede recuperarse o presentar un deterioro clínico y presentar los signos de alarma descritos en la figura 6, los signos de alarma son el resultado de un incremento de la permeabilidad capilar y marcar el inicio de la fase crítica. Puede aparecer dolor abdominal intenso y continuo, vomito persistente, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, alteración del estado de conciencia, hepatomegalia y un aumento progresivo del hematocrito.

2.7.3 **Dengue grave o severo:** esta se define por la extravasación de plasma, acumulación de líquido con dificultad respiratoria o ambas, sangrado profuso que sea considerado clínicamente importante por los médicos tratantes, o compromiso grave de los órganos. Cuando esto ocurre puede producirse el choque y este se considera cuando la presión del pulso (es decir la diferencia entre la presión sistólica y diastólica) es de 20 mm Hg o menor, o si hay signos de mala perfusión capilar, como extremidades frías, llenado capilar lento o pulso rápido y débil en niños y adultos.

En Honduras para fines de vigilancia y manejo clínico de los pacientes, las manifestaciones del dengue se clasifican en forma similar a los lineamientos propuestos por la OMS, pero con algunas variaciones de acuerdo a las características clínicas observadas en la población hondureña y a las herramientas disponibles para evidenciar algunos de los signos clínicos. Esta clasificación clínica (del Grupo A al grupo D) fue

elaborada debido a la necesidad de estandarizar criterios en el manejo de pacientes con dengue en los centros asistenciales del país [Honduras, 2004].

Grupo A: cuadro febril de inicio brusco, con una duración de hasta siete días, cefalea intensa, mialgias, artralgias y dolor retro-ocular, puede presentarse exantema, leucopenia, presencia o no de sangrado. **Grupo B:** todo paciente con cualquiera de lo siguiente (pero sin signos de alarma); caso febril con petequias u otro sangrado espontáneo; prueba de torniquete positivo, trombocitopenia menor o igual a 100,000 plaquetas/mm³. **Grupo C:** paciente con cuadro de dengue clásico más los siguientes signos de alarma; dolor abdominal intenso y sostenido; vómitos persistentes; descenso brusco de temperatura; irritabilidad y/o somnolencia. Estos pacientes tienen riesgo aumentado para desarrollar choque. **Grupo D:** paciente con cuadro de dengue clásico más los signos de choque; taquicardia, frialdad distal, pulso débil no perceptibles, hipotensión arterial, cianosis, sudoración sin fiebre, presión arterial media disminuida, palidez exagerada, cambios en estado de conciencia.

2.8 Patogenia del dengue

Los eventos que desencadenan la enfermedad por dengue comienzan con una persona infectada con el virus dengue a través de la picadura de un mosquito hembra que contiene al virus. El virus se localiza y se replica en diversos órganos diana, por ejemplo, nódulos linfáticos locales e hígado, luego se libera de estos tejidos y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos. El virus permanecerá circulando en la sangre, una viremia que dura aproximadamente cinco días. Los síntomas comienzan a aparecer en un promedio de cuatro a siete días. Cuando se produce una nueva infección

con otro serotipo de dengue, se produce una respuesta inmune que pudiera exacerbar la enfermedad debido a los anticuerpos preexistentes no neutralizantes para el serotipo actual, estos estimulan la entrada de los virus en los macrófagos, lo que activa los linfocitos T de memoria, provocando la secreción de citocinas inflamatorias e inicia las reacciones de permeabilidad vascular, causando hemorragias internas y pérdida de plasma, lo que da lugar a síntomas relacionados con el DH y SCD [Gubler, 1998]. Los síntomas causados por la infección por dengue pueden durar de tres a diez días, con un promedio de cinco días, de modo que la enfermedad persiste durante varios días después de haber concluido la viremia.

Las diferencias en la virulencia del virus [Rosen, 1977] también se han sugerido para explicar la patogénesis del DH, entre ellas la exposición de serotipos con diferente virulencia [Watts et al., 1999], la secuencia de los serotipos infectantes [Gibbons et al., 2007] con distinto potencial epidémico y patogénico.

2.9 Inmunopatogenia

Los sucesos que desencadenan la severidad del dengue aún están por dilucidarse y mucho tiene que ver con la respuesta del sistema inmune del individuo. La respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo origina anticuerpos neutralizantes capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y en menor medida contra los heterólogos, debido a anticuerpos específicos que neutralizan al serotipo infectante pero son sub-neutralizantes o no neutralizantes para los otros serotipos. Durante una infección secundaria con un serotipo diferente, estos anticuerpos

pre-existentes no neutralizantes forman complejos inmunes que son presentados a través de los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas (Igs) a la membrana de las células del sistema fagocítico, estimulando la entrada de los virus en los monocitos/macrófagos que resultan en una alta activación de linfocitos T. Esta amplificación se ve aumentada por el hecho que los linfocitos T-CD4⁺ específicos para el virus del dengue producen IFN γ que a su vez regula la expresión de los receptores de Fc γ , dando como resultado una incrementada secreción de citocinas y mediadores químicos (TNF, IL-2, IL-6, PAF, C3a, C5a e histamina) iniciando las reacciones de permeabilidad vascular, provocando hemorragias y pérdida de plasma sanguíneo, lo que puede dar lugar a las manifestaciones clínicas del DH y SCD [Gubler, 1998; Kurane, 2007].

2.10 Determinantes genéticos asociados al Dengue

Un polimorfismo genético es una variación en la secuencia genómica de un determinado gen, entre los individuos de una población. Esta variación puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada por ejemplo, la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina) o puede ser más complicado por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de nucleótidos, donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de una secuencia específica. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población, a las variaciones menos frecuentes se les conocen simplemente como mutaciones.

Varios estudios han demostrado que algunos polimorfismos genéticos pueden proteger o predisponer a que un individuo desarrolle DH/SCD. A continuación se describen algunos de ellos.

2.10.1 *Antígenos leucocitarios humanos (HLA)*, cuyos genes están en el cromosoma 6, estos codifican las moléculas celulares de superficie especializadas en la presentación de determinantes antigénicos a receptores de los linfocitos T.

Los HLA clase I, consisten en los alelos A, B y C, tienen una amplia distribución y están presentes en la superficie de todas las células nucleadas y plaquetas. Los antígenos que están asociados a los HLA clase I interactúan con los linfocitos T CD8 durante la respuesta inmune.

Los HLA clase II, consisten en los alelos DR, DP y DQ, estos tienen distribución más limitada entre los linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y linfocitos T activados.

Los haplotipos HLA en general han sido asociados tanto a susceptibilidad como a protección hacia el dengue, en poblaciones de Vietnam [Loke et al., 2001], Cuba [Sierra et al., 2007a] y México [LaFleur et al., 2002] entre otros.

2.10.2 *DC-SIGN: (Dendritic Cell -Specific Intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin)*, es un receptor de lectina C tipo II expresada por células dendríticas localizada en el CD209 en el cromosoma 19. Estudios recientes indican que las células dendríticas (las cuales son residentes naturales de la piel), son susceptibles a la infección con el virus dengue [Marovich et al., 2001]. Variaciones genéticas en el CD209 pueden alterar la expresión del DC-SIGN. Se han encontrado polimorfismos en el promotor del gen (posición-139 y -336) asociados a infección por VIH, indicando que el genotipo -336 G/G puede estar asociado a protección contra la infección por VIH [Selvaraj et al., 2009].

Estudios en Tailandeses, en el promotor del CD209 que codifica para DC-SIGN1-336, receptor presente en células dendríticas revelan que un polimorfismo en individuos que poseen el alelo G (GG y GA) en esta posición, tienen mayor predisposición a padecer DH (con una frecuencia de 22.4%) en comparación con DC (con una frecuencia de 4.7%) en tres cohortes independientes en Tailandia [Sakuntabhai et al., 2005].

2.10.3 *Receptor Fcγ (FcγR)* es un receptor ampliamente distribuido en las células hematopoyéticas, y se han descrito tres clases de receptores en los leucocitos humanos FcγRI codificado en el CD64, el FcγRII en CD32, y el FcγRIII en CD16. Estos receptores median una variedad de respuestas biológicas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, endocitosis, fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y aumento en la presentación de antígenos. Cada clase de receptor varía en peso molecular, afinidad de unión a diferentes subclases de inmunoglobulinas G (IgG) y su distribución en la superficie de monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células de Langerhans [Lehrnbecher et al., 1999b].

En humanos se han descrito dos isoformas funcionales del FcγRIIA, donde la sustitución de una sola base (G por A) en el codón del aminoácido 131 resulta en un cambio del dominio extracelular del receptor (R; codón CGT para arginina o H; codón CAT para histidina) alterando la afinidad de la unión para la IgG. La isoforma del FcγRIIA-H131 posee más alta afinidad que la isoforma FcγRIIA-R131.

Este FcγRIIA ha sido asociado a desordenes inmunes en relación con las plaquetas [Brandt et al., 1995], también ha sido asociado a infecciones recurrentes del tracto respiratorio, [Sanders et al., 1994]. Recientemente el FcγRIIA ha sido asociado a DH,

donde homocigotos para la variante arginina tienen menos capacidad para opsonizar anticuerpos IgG2 y puede por ende jugar un rol de protección contra DH [Loke et al., 2002]. Siendo la respuesta inmune mediada por la captación de las Igs un factor importante de la patogenia del DH, se considera de mucha importancia estudiar los polimorfismos en este receptor.

2.10.4 *Receptor de vitamina D (VDR)*, se encuentra localizada en el cromosoma 12 con un tamaño de más de 100 Kb, la forma activa de la vitamina D 1,25-dihidroxitiamina D, ejerce efectos inmuno-regulatorios a través del VDR, una alta concentración de VDR es detectada en macrófagos y linfocitos T especialmente CD8⁺. Tres diferentes polimorfismos en el gen del VDR han sido estudiados [Uitterlinden et al., 2004], un SNP en particular en la posición 352 del gen VDR se ha asociado con resistencia a varias enfermedades infecciosas [Huang et al., 2010; Roy et al., 1999; Wilkinson et al., 2000].

En un estudio realizado en niños vietnamitas se observó que el alelo C (t) en la posición 352 en el gen del VDR, se asocia con protección a dengue severo [Loke et al., 2002].

2.11 Diagnóstico del dengue

Un diagnóstico definitivo de dengue puede hacerse solo por medio de pruebas de laboratorio como son: el aislamiento del virus, detección del ácido nucleico viral, los antígenos o anticuerpos específicos del virus; o una combinación de estos.

Después de la aparición de la enfermedad, el virus puede ser detectado en suero, plasma, células sanguíneas circulantes y otros tejidos, con mayor probabilidad durante los

primeros cinco días de síntomas. Durante las primeras etapas de la enfermedad o fase aguda, el aislamiento viral, la detección del ácido nucleico o de antígenos específicos se pueden utilizar para diagnosticar la infección. A partir del sexto día de iniciados los síntomas, la detección de anticuerpos IgM específicos es el método de elección para el diagnóstico.

Cuando un individuo tiene un primer contacto con el virus desarrolla una respuesta de anticuerpos primaria caracterizada por un aumento lento de anticuerpos específicos. Los anticuerpos IgM son las primeras inmunoglobulinas del sistema inmune humoral en aparecer. Los niveles máximos de anticuerpos IgM se presentan a las dos semanas después de la aparición de los síntomas y con una disminución general a niveles indetectables de dos a tres meses. Los anticuerpos IgG son generalmente detectables en títulos bajos al final de la primera semana de enfermedad, aumentando lentamente a partir de entonces, con niveles de IgG en suero aún detectables después de varios meses, y que persisten durante toda la vida.

En una infección secundaria del dengue (un individuo que es re-infectado con un serotipo distinto del virus) los títulos de anticuerpos IgG aumentan rápidamente, detectándose en niveles altos, incluso en la fase aguda. A principios de la convalecencia en las infecciones secundarias los niveles de anticuerpos IgM son significativamente inferiores a los que se presentan en las infecciones primarias y pueden ser indetectables en algunos casos.

2.11.1 Aislamiento viral

Existen varios sistemas disponibles para el aislamiento viral: inoculación intra-cerebral en ratones recién nacidos, en los que la infección produce parálisis y otros signos que afectan el sistema nervioso central, este método es costoso y los resultados no se obtienen

rápidamente; cultivos celulares se realizan tanto en líneas celulares de mamíferos (Vero, LLCMK₂) como en células de mosquitos (C6/36, AP-61) siendo estas últimas las más sensibles.

2.11.2 Diagnóstico molecular

La Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), permite la identificación de los serotipos en muestras de plasma y sobrenadantes de células infectadas con el virus. El RT-PCR es útil para obtener información rápida de los serotipos circulantes de dengue; sin embargo, es muy importante realizar la prueba en la etapa de viremia en el individuo, durante los primeros 5 días de iniciados los síntomas.

2.11.3 Diagnóstico serológico

Existen varias pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de infección por el virus dengue: inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento, prueba de neutralización, ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos IgM e IgG, entre otras.

a. Inhibición de la hemaglutinación (IHA).

Esta prueba fue la más usada para el diagnóstico serológico de rutina en la infección por dengue, debido a su sensibilidad y a un requerimiento mínimo de equipo para su realización, esta prueba es ideal para estudios sero-epidemiológicos, y se basa en que el virus, bajo condiciones controladas de pH y temperatura, puede aglutinar glóbulos rojos de ganso y su efecto puede ser inhibido por anticuerpos específicos.

b. Prueba de neutralización.

Es la prueba serológica más sensible y más específica para el diagnóstico de la infección por el virus dengue, y se basa en que el virus dengue produce efectos citopáticos, que pueden ser observados como placas en cultivos celulares susceptibles.

c. Detección de anticuerpos IgM e IgG contra dengue por medio de ensayos inmunoenzimáticos (conocidos como ELISA).

Esta prueba se ha considerado la más útil para el diagnóstico de la infección por dengue, debido a su alta sensibilidad y a la facilidad de su empleo; el resultado se obtiene en unas pocas horas y no requiere de equipo complejo para su realización.

2.12 Prevención y Control

La prevención y control del dengue es una prioridad a nivel mundial, para evitar su expansión cada vez mayor. Desafortunadamente las herramientas para prevenir la infección del dengue son limitadas. En la actualidad, el único método de controlar o prevenir la transmisión del dengue consiste en la lucha contra los vectores. El control de los vectores se basa en la gestión del medio ambiente y los métodos químicos que lo minimizan. La eliminación adecuada de los residuos sólidos y la mejora de las prácticas de almacenamiento de agua, entre ellas el mantenimiento de los recipientes tapados para evitar que los mosquitos hembra pongan sus huevos, son medidas que deben fomentarse en los programas comunitarios.

Capítulo 3. Metodología

3.1 Diseño del estudio

- 3.1.1 Tipo de investigación: caso y control retrospectivo.
- 3.1.2 Período del estudio: de Agosto 2010 a Septiembre 2011.
- 3.1.3 Población en el estudio.

Individuos que estén padeciendo o hayan padecido DC o tengan evidencia serológica de infección con el virus dengue (con o sin sintomatología asociada) que constituyen los controles, e individuos que estén sufriendo o hayan padecido DH, estos constituyen los casos. La clasificación de los casos se hizo siguiendo las normas nacionales de clasificación de dengue, antes mencionadas como Grado A, B, C o D.

3.2 Tamaño de muestra

Se incluyo en el estudio un total de 200 muestras de individuos, 100 de las muestras correspondían a los controles o DC y las otras 100 correspondían a los casos de DH, las cuales en su totalidad habían sido previamente genotipificadas con tecnología de MassArrays basado en polimorfismos de nucleótido simple (SNP) para ser comparado con una sub-muestra de esta población (10%) con la técnica de polimorfismos determinados por medio de PCR-RFLP. A las 200 muestras se le realizaron pruebas serológicas para procurar clasificar las infecciones en primarias y secundarias.

3.3 Criterios de inclusión y exclusión

- 3.3.1 Criterios de Inclusión:

Todos aquellos individuos que padecían o habían padecido dengue clásico o hemorrágico según criterios antes mencionados y que fueran confirmados por serología o RT-PCR, y que accedieron a participar, previo consentimiento informado (Apéndice 2), consentimiento de parte de los padres o guardianes en niños entre 1-18 años y asentimiento en los casos de niños entre 8-18 años (Apéndice 3).

3.3.2 Criterios de exclusión:

Personas que rehúsen participar y niños menores de un año.

3.4 Toma de muestras

Algunos de los participantes fueron enrolados mediante vigilancia activa en el Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS) en las salas de pediatría y sala mixta de dengue para adultos. A los casos de dengue clásico y dengue hemorrágico en fase aguda o febril (menos de 6 días de inicio de síntomas) se les tomó una muestra de sangre total, entre 5-7 ml en tubos estériles con EDTA en el caso de los adultos, y de 3-5 ml en niños. Para aquellos individuos que tuvieran más de 6 días de síntomas se tomó una muestra de sangre en tubos sin anticoagulante (en iguales condiciones de volumen como antes descrito) y adicionalmente una muestra con anticoagulante EDTA. A los participantes captados retrospectivamente, confirmados por diagnóstico clínico o por laboratorio, se les tomó una muestra de sangre total, entre 5-7 ml en tubos estériles con EDTA en el caso de los adultos, y de 3-5 ml en niños. Las muestras fueron colocadas en hieleras a 4°C, y transportadas al laboratorio de Virología de la Escuela de Microbiología de la UNAH.

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio de virología se procedió a realizar la separación del suero de la muestra de sangre sin anticoagulante el cual fue codificado y almacenado a -20°C . De la muestra de sangre total (EDTA) se procedió a la separación de linfocitos, se lisaron los glóbulos rojos con el buffer de lisis comercial (Roche® Diagnostic, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y también se separó el plasma por centrifugación, ambas muestras fueron codificadas y guardadas a -80°C .

3.5 Análisis de las muestras

Los sueros de los participantes fueron utilizados para determinar la presencia de los anticuerpos IgM con el fin de confirmar el diagnóstico en aquellos casos captados prospectivamente, también se determinó la presencia de anticuerpos IgG para poder clasificar las infecciones primarias y secundarias en todas las muestras del estudio. El plasma fue utilizado al realizar pruebas moleculares para determinar la presencia del virus en aquellos pacientes que cursaban la enfermedad en ese momento (fase aguda). Los linfocitos extraídos de sangre total se utilizaron para las pruebas de genotipificación por PCR-RFLP. El flujograma de trabajo se resume en la figura 1.

3.5.1 Análisis serológicos

Se analizaron los sueros de los participantes por determinación de anticuerpos IgG e IgM contra dengue, a través de ensayos inmunoenzimáticos con pruebas comerciales (PanBio®, Brisbane, Australia) de acuerdo a las instrucciones y las especificaciones del fabricante. Adicionalmente se realizó la prueba de Inhibición de Aglutinación para la medición de anticuerpos totales contra dengue.

a. Prueba inmunoenzimática IgM captura. Se utiliza para la determinación de anticuerpos IgM contra el dengue en muestras de suero y se recomienda realizar después de los 5 días de iniciados los síntomas, debido a que este es el tiempo que generalmente toman en aparecer en circulación. El suero que contiene anticuerpos IgM contra dengue se hace reaccionar con anticuerpos anti-IgM humana acoplados a los pocillos de la microplaca, los cuales si están presentes son capturados, el suero residual es removido por lavado, posteriormente se hace reaccionar con una mezcla de antígenos recombinantes de los cuatro serotipos de dengue, después de un período de incubación se lava la microplaca y se adiciona un conjugado que consiste en un anticuerpo anti-dengue marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), después del tiempo de incubación y lavado se adiciona el sustrato Tetrametilbenzidina (TMB), la reacción se detiene con ácido. Una reacción positiva se manifiesta por la producción de color amarillo, la cual se lee a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650nm en un lector de ELISA (TECO DIAGNOSTICS®, Anaheim, California, EUA). Un resultado positivo es indicativo de una infección activa por dengue.

b. Prueba inmunoenzimática IgG indirecta. Se utiliza para la determinación de los anticuerpos IgG contra el dengue. Esta prueba serológica es útil para diferenciar infecciones primarias y secundarias del dengue.

Los anticuerpos IgG en el suero, cuando están presentes, se combinan con una mezcla de antígenos de los cuatro serotipos del dengue acoplados a los pocillos de la microplaca, después de la incubación el suero residual es removido por lavado y se le agrega a la reacción una anti IgG humana marcada con peroxidasa HRP, después de la incubación los pocillos son lavados y se le agrega el sustrato TMB, este es hidrolizado por la enzima.

Después de que se detiene la reacción con ácido se observa un cambio de color indicativo de la presencia de anticuerpos IgG en la muestra de estudio. Se procede a la lectura de la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm. Un resultado positivo es indicativo de la presencia de anticuerpos IgG.

c. Prueba inmunoenzimática IgG de Captura. Se utiliza para la determinación de niveles altos de anticuerpos IgG contra el virus del dengue, característico en infecciones secundarias.

El suero del paciente, si contiene anticuerpos IgG contra los antígenos de dengue, se combina con anti IgG humana adherida a la superficie de la microplaca, después de una incubación y lavado se hacen reaccionar con una mezcla de los cuatro antígenos recombinantes de dengue, posteriormente se adiciona el conjugado que consiste en anticuerpos monoclonales anti-dengue marcados con la enzima HRP. Después del lavado se adiciona el sustrato TMB cuya reacción es interrumpida con ácido, un cambio de color indica la presencia de anticuerpos IgG contra dengue en la muestra. Se procede a leer la absorbancia de los pocillos a 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm. Un resultado positivo (mayor de 22 unidades PanBio) es indicativo de una infección secundaria de dengue.

d. Prueba Inhibición de la Hemaglutinación (IHA): Para realizar la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación, se deben de preparar los glóbulos rojos obtenidos del ganso, tratar las muestras a analizar y titular el antígeno de dengue previamente para realizar la prueba de IHA.

Para la **preparación de los eritrocitos** se obtienen asépticamente 5ml de eritrocitos de ganso los cuales se depositan en un frasco estéril que contenga 15 ml de Alsever's (proporción 1:4), se guardan durante 24 horas para que se estabilicen. Luego se centrifugan para eliminar el Alsever's, se lavan tres veces los con PBS 1X a 1500 rpm por 10 minutos. Después del último lavado se preparan los eritrocitos en PBS al 50% y 8%. Para la prueba de Hemaglutinación e Inhibición de Hemaglutinación se hace una dilución 1:24 de los eritrocitos al 8%, usando solución reguladora para suspensiones de eritrocitos a pH 6.0, 6.2, 6.4, 6.6. Esta suspensión leída a 490 nm contra un blanco de buffer pH 7.0 debe dar una densidad óptica (O.D) de 0.75.

Para el **tratamiento de las muestras** por el método de Kaolin con el fin de eliminar los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación que pueden estar presentes en los sueros humanos. A 0.1 ml de suero se le agrega 0.4ml de solución salina boratada pH 9.0 y 1 ml de Kaolin al 25%. Se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos agitando vigorosamente cada 10 minutos. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos, luego se trasvasa el sobrenadante a nuevos tubos colocándolos en hielo y se agregan 50 ul de eritrocitos de ganso al 50% en PBS. Se incuban por 20 minutos con agitación ocasional. Nuevamente se centrifugan a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se coloca en viales, se rotula y guarda a -20°C hasta el momento de su uso. Para eliminar las aglutininas inespecíficas se absorben los sueros con eritrocitos de ganso.

Para la **titulación del antígeno** (hemaglutinación) se rehidrata el antígeno liofilizado de dengue en 0.5ml de agua destilada estéril, se mezcla y guarda a 4°C durante la noche. Luego se prepara una dilución 1:10 en solución salina boratada con albúmina 0.4%

(BABS 0.4%), se mezcla. El antígeno rehidratado se guarda a 4°C si se va a usar inmediatamente, en caso contrario a -70°C.

Para determinar el pH óptimo de los antígenos se prueba con soluciones pH 6.0, 6.2, 6.4, 6.6. En placas de microtitulación fondo en "U", hacer diluciones dobles consecutivas partiendo de 1:10 hasta 1:2560, utilizando BABS 0.4%. Se colocan 50 ul de BABS 0.4% del segundo pocito en adelante, se colocan 100 ul de antígeno en el primer pocito y se realizan las diluciones pasando 50 ul del antígeno al segundo pocito y así sucesivamente. Luego se agregan 50 ul de eritrocitos de ganso 1:24 en los pH 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, a todos los pocitos mientras se agita en un vibrador. Se incluye un control de eritrocitos para cada pH que lleve 50 ul de BABS 0.4% y 50 ul de eritrocitos de ganso 1:24. Todo se incuba a temperatura ambiente por 30-45 minutos después de lo cual se leen los resultados.

Para realizar la Prueba de inhibición de la hemaglutinación, se agregan 25 ul de BABS 0.4% del pocitos 2 al 12. Luego se agregan 50 ul de los sueros tratados (dilución 1:10), al primer pocito de cada placa, también se agregan 25 ul del mismo suero al último pocito de cada línea para el **control de suero**.

Se procede a hacer diluciones dobles consecutivas de cada suero, y se agregan 25 ul de antígeno (conteniendo 4-8 unidades hemaglutinantes) a cada pocito que contenga el suero diluido. No se le agrega antígeno al control de suero.

Para hacer el **control de antígeno**, se colocan 50 ul de BABS 0.4% del pocito 2 al 12. Dispensar en el primer pocito 50 ul de la dilución de antígeno que contiene 4-8 unidades/25 ul. En el segundo pocito dispensar 50 ul de antígeno y hacer diluciones dobles consecutivas hasta el pocito 12. A continuación se cubre la placa para incubar una

hora a temperatura ambiente. Después se Añaden 50 ul de la suspensión de eritrocitos 1:24 en el pH óptimo a todos los pocitos. Para hacer el **control de células o eritrocitos** agregar a una línea de pocitos 50 ul de BABS 0.4% + 50 ul de eritrocitos. Se deja incubando a temperatura ambiente de 30-45 minutos y se leen los resultados. La dilución más alta del suero que muestra completa inhibición de la Hemaglutinación (formación de un botón de células) se interpreta como el título de la inhibición de la hemaglutinación.

Un caso de Dengue con una muestra tomada en período convaleciente (7 o más días después de iniciado los síntomas) y con un título igual o mayor a 2560 se considera como un caso secundario de Dengue.

Un caso de Dengue que se encuentre en los 5 primeros días de la enfermedad y presente algún título de anticuerpo se considera como un caso secundario de Dengue.

Para determinar el estatus inmunológico de los participantes, las infecciones primarias y secundarias se realizó la prueba de ELISA IgG indirecta, en el suero de los participantes en fase convaleciente o en aquellos que se captaron de forma retrospectiva. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, todas aquellas muestras que presenten >40 unidades PanBio (UP) nos indican una infección secundaria, las que presentan de 11-40 unidades son identificadas como infecciones primarias, entre 9-11 se consideran indeterminadas. A las muestras > 40 UP se les realizó la prueba de IgG de captura para corroborar por otro método alterno las infecciones secundarias. Aquellas muestras que presentaban 9-11 UP para IgG indirecta se les realizó una prueba Inhibición de la hemaglutinación.

3.5.2 *Identificación y tipificación del virus de Dengue.*

Se realizó por medio de un RT-PCR, el método utilizado, es el desarrollado por Lanciotti [Lanciotti et al., 1992] modificado por Rosario [Rosario et al., 1998] y actualmente estandarizado en el laboratorio de Virología de la UNAH. Este método se desarrollo para aquellos pacientes que fueron captados en los primeros 5 días de inicio de los síntomas, con el fin de confirmar el diagnóstico.

a. Extracción de ARN de plasma sanguíneo. Se llevó a cabo la extracción de ARN mediante el método QIAmp RNA Blood mini kit (QIAGEN®, Santa Clarita, California, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ARN se utilizo para el RT-PCR.

b. RT-PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa) Este método es un PCR anidado multiplex, se agregan 10 ul del ARN extraído a 90 ul de una mezcla con los siguientes componentes: solución amortiguadora 5X de la enzima AMV RT, 25mM dNTPs, 100 mM de ditioneitol (DTT), 1.5 mM MgCl₂, 100 pmoles de cada uno de los iniciadores D1(5'TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACC G3') y D2 (5'TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC3')(Invitrogen®, CA), 10 U de la enzima transcriptasa reversa AMV (Promega® Corporation, EUA), y 5 U de Taq polimerasa (Promega® Corporation, EUA), se colocan las reacciones en un termociclador (GeneAmp®PCR System 9700, Applied Biosystem®, California, EUA) programado para una incubación de 40 minutos a 42 °C y 94°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anidamiento a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 2 minutos con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Se inicia una segunda reacción de amplificación con 1 ul del producto de la primera amplificación. La mezcla usada para la segunda reacción tiene todos los componentes usados en la primera, con las siguientes excepciones: se reemplaza el iniciador D2 con iniciadores para los serotipos específicos TS1 (5'CGT CTC AGT GAT CCG GGG G3'), TS2 (5'CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG3'), TS3 (5'TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C3') y TS4 (5'CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A3') y se eliminan de la mezcla de reacción el DTT y la AMV. Las muestras se someten a 95°C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anidamiento con el iniciador a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se visualizan por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñida con bromuro de etidio. Debido a la posición en que actúa cada uno de los iniciadores para los distintos serotipos de virus del dengue, el tamaño de la banda de ADN obtenida es distintivo para cada serotipo de virus. DEN-1: 482 pb, DEN-2: 119 pb, DEN-3: 290 pb, DEN-4: 392 pb.

3.5.3 Marcadores genéticos

Los polimorfismos fueron determinados a través MassArrays con la plataforma del SEQUENOM iPLEX assay process, y esta se comparó con la metodología de PCR-RFLP. Para la realización del PCR-RFLP, se hizo una extracción de ADN a partir de Linfocitos de sangre periférica, con el cual se procedió a realizar el PCR convencional y luego la digestión con enzimas de restricción. Para dos de los tres polimorfismos se hizo una purificación de los productos de PCR para luego proceder a la digestión.

a. Extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica

Las extracciones de ADN se realizaron mediante el método QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN®, Santa Clarita, California, EUA) a partir de los linfocitos obtenidos de los participantes, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

b. Medición de la concentración de ADN

La concentración de ADN fue medida por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®, EUA), para asegurarse de poseer la concentración de ADN (100 ng) requerido para los análisis.

c. Determinación de los SNPs por medio de MassArrays

Las 200 muestras de ADN fueron enviadas al Centro de Tecnología de Genética Analítica (AGTC) en Toronto, Canadá, para determinar el genotipo en los SNPs de interés, este sistema combina la extensión con iniciadores específicos de PCR con la espectrofotometría de masas, resultando en una diferenciación alelo-especifica, visualizados en tiempo real, estos resultados fueron automáticamente enviados a una base de datos para su análisis [Gabriel et al., 2009].

d. Determinación de los SNPs por medio de PCR-RFLP

Se procedió a realizar la técnica de PCR-RFLP en el laboratorio de Virología de la UNAH. Primero se ajustaron las concentraciones de los reactivos y enzimas a utilizar así como de los iniciadores para el PCR con el objetivo de amplificar el área genómica de

interés, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa para verificar la amplificación. En los casos requeridos se procedió a purificar el producto de amplificación del PCR, para luego someterlo a digestión con las enzimas de restricción y los polimorfismos fueron visualizados en bandas de diferentes tamaños por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Polimorfismos del DC-SIGN 1-336. Se utilizó como base el método descrito por Selvaraj [Selvaraj et al., 2009] al cual se le realizaron algunas modificaciones que después de varias pruebas y comunicaciones con el autor del artículo en mención, se realizó de acuerdo a como se describe a continuación.

Para el PCR, una región de 150 pb fue amplificada en 25ul de reacción conteniendo 100 ng de ADN, solución amortiguadora 1X conteniendo 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl y 1.5 mM de MgCl₂, adicionalmente 10 pmoles de cada iniciador (5'GGA TGG TCT GGG GTT GAC AG-3' y 5'-ACT GGG GGT GCT ACC TGG C-3'), 200 uM de dNTPs y 1U de Taq polimerasa (Promega® Corporation, EUA). Las condiciones de reacción del PCR fueron a 95°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, un anidamiento a 59°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 2 minutos. Los productos amplificados fueron visualizados después de una electroforesis corrida por 45 minutos a 80 voltios en geles de agarosa al 2.5%. Luego de la amplificación se purificaron los productos con un kit de purificación comercial, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (illustra™, GE Healthcare, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el RFLP, en una reacción de 20 μ l, se tomaron 10 μ l de los productos amplificados y se sometieron a digestión con 5 U de la enzima de restricción *MscI* (BioLabs® Inc. E.U.A.), solución amortiguadora de la enzima 1X y BSA al 0.1 μ g/ μ l (este fue agregado posterior a revisión bibliográfica y mostro una mejora de los resultados esperados), por 3 horas a 37°C. El producto de la digestión fue visualizado por electroforesis después de 55 min a 80 voltios en gel de agarosa al 3%, en donde se observaron bandas de diferentes tamaños. El alelo G conteniendo el sitio de restricción debió mostrar 2 bandas de 131 pb y 19 pb. La forma alelica A que carece del sitio de restricción dará una sola banda de 150 pb.

Polimorfismos en el receptor Fc γ RIIA. Se utilizó el método descrito por Jiang [Jiang et al., 1996] con algunas modificaciones como se describe a continuación.

Después de la extracción de ADN una región de 366 pb fue amplificada por medio de un PCR, al cual se le ajustaron las concentraciones de sus componentes de reacción, en 100 μ l de reacción con 100 ng de ADN, se colocaron 2 pmol de cada iniciador (5'-GGA AAA TCC CAG AAA TTC TCG C-3' y 5' CAA CAG CCT GAC TAC CTA TTA CGC GGG-3') 100 μ M de cada dNTP, solución amortiguadora (150 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 9), 0.1% Tritón X-100) y 1 U de Taq polimerasa (Promega® Corporation, EUA.), se colocó en un termociclador (Applied Biosystem®, California, EUA) a 95°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, un anidamiento a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 40 segundos. Los productos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio por 1 hora a 100 voltios. Luego de la amplificación se purificaron los productos como se describió previamente.

Para el RFLP, 20ul del producto amplificado fue sometido a digestión con 20 U de enzima de restricción *BstUI* (BioLabs® Inc. E.U.A) a 60°C toda la noche, el producto digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 3%, por 80 min a 100 voltios, en donde se observó mejor la separación de las bandas y por ende mejores resultados, teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta. El alelo C (R) fue visualizado con una banda de 322 pb, y el alelo T (H) con una banda de 343pb.

Polimorfismos en el Receptor de la vitamina D. Se utilizó el método descrito por Dilmec [Dilmec et al., 2010], se ajustaron las concentraciones de los componentes del PCR y se realizaron algunas modificaciones. Para este NSP, no se requirió el paso de purificación como en los anteriores.

Para el PCR, después de la extracción de ADN fue amplificada una región de 745 pb en 20 ul de reacción conteniendo 20-100 ng ADN, 0.2mM dNTPs, 2 pmol de cada iniciador (5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3' y 5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3'), 2 mM MgCl₂, 1X solución amortiguadora con sulfato de amonio y 0.3 U de Taq polimerasa (Promega® Corporation, EUA), la reacción se colocó en un termociclador (Applied Biosystem® , California, EUA) a 94°C por 3 minutos seguido por 10 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30segundos, un anidamiento de 72-62 °C por 30 segundos (decreciendo 2°C por ciclo) y una extensión a 72°C por 30 segundos, luego 20 ciclos a 94°C por 30segundos, 62 °C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos fueron visualizados en electroforesis después de 45 min a 100 voltios en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

Para el RFLP, 5ul del producto amplificado fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *TaqI* (BioLabs® Inc. E.U.A) a 65°C durante 2 horas, el producto digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio y revelado con luz ultravioleta. El alelo T se visualizó con dos bandas de 494 y 251 pb; el alelo C, con tres bandas de 293, 251 y 201 pb.

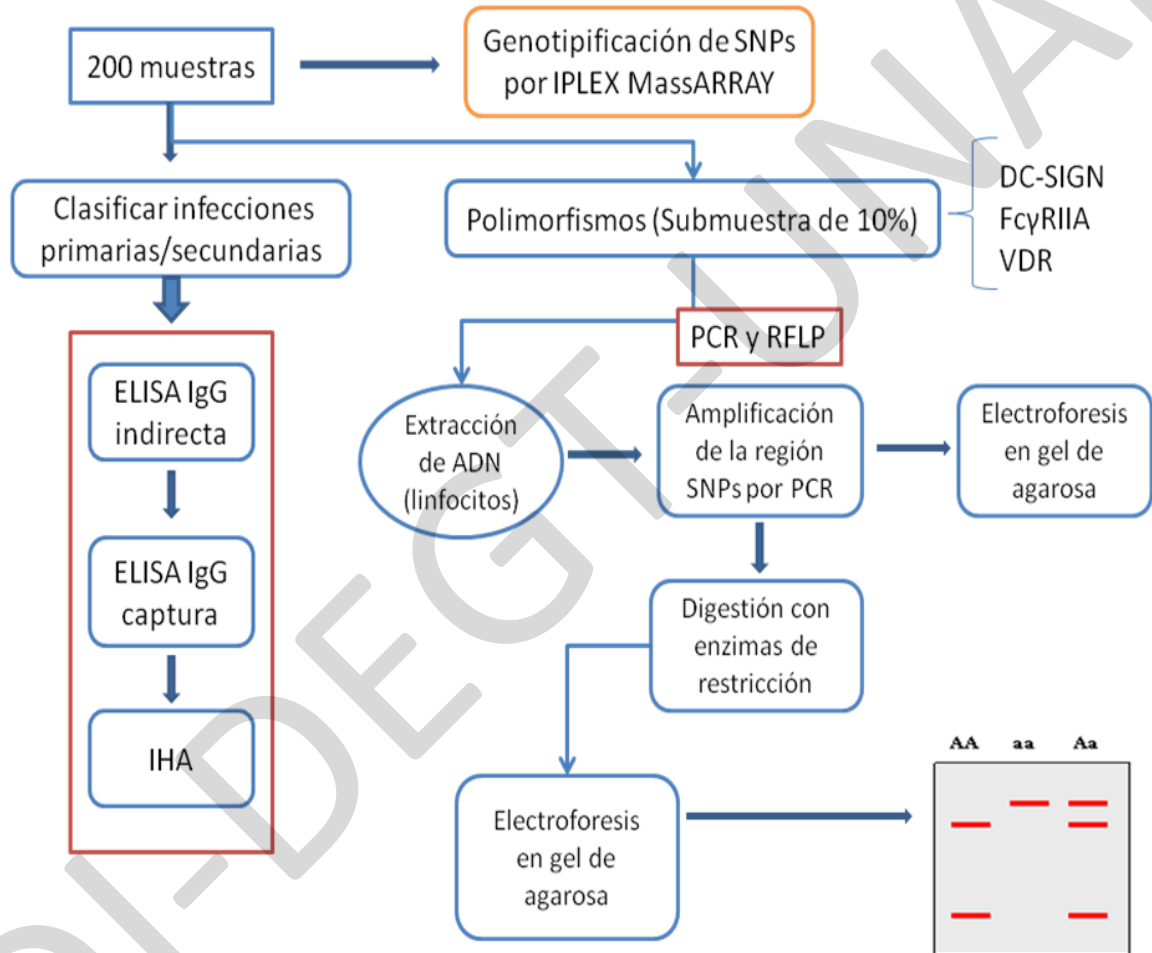


Figura 1. Flujograma de trabajo para Factores Genéticos e Inmunológicos en el Huésped, Asociados con Dengue en Tegucigalpa, Honduras.

3.5.4 Análisis de datos

- a. Determinación de la frecuencia de casos primarios y secundarios de DC y DH, definidos por métodos serológicos.
- b. Análisis de los polimorfismos en los casos y controles obtenidos por la genotipificación de los polimorfismos por MassArrays, a través de la prueba de chi cuadrado (X^2), el valor P , y la razón de probabilidades (OR) con un 95% de confianza, utilizando el programa SPSS(versión 11.5.1)
- c. Análisis de la concordancia de los resultados obtenidos por medio de la técnica de la plataforma del SEQUENOM μ PLEX assay process y el PCR-RFLP a un 10% de la población en estudio.

3.5.5 Condiciones de bioseguridad

Se tomaron las precauciones para el trabajo con el virus dengue de acuerdo a las normas internacionales de bioseguridad que se requiere para un laboratorio nivel II. Todas las muestras han sido almacenadas en recipientes sellados debidamente etiquetados.

Todos los procedimientos operativos estándar se encuentran debidamente documentados para el desarrollo de esta investigación en los Apéndices de este documento.

3.5.6 Consideraciones Éticas

Este estudio fue sometido al comité de ética de investigaciones biomédicas de la unidad de investigación científica (CEIB-UIC) de la UNAH para su aprobación. En el protocolo aprobado (Apéndice E) se incluyó la realización de las pruebas de genotipificación por medio de la plataforma del SEQUENOM μ PLEX assay process a todas las 200 muestras (100 casos y 100 controles), la parte adicional fue hacer los estudios serológicos y las

pruebas moleculares de PCR y RFLP, por lo cual la aprobación cubre estos aspectos pues se trata de los mismos propósitos de estudio.

Todos los participantes en este estudio fueron informados sobre los objetivos de esta investigación y se les leyó una carta de invitación (Apéndice B), se obtuvo la firma de un consentimiento/asentimiento informado (Apéndice C y D) del cual el participante recibió una copia firmada después que habían aceptado participar de forma voluntaria. En caso de niños entre 8-17 años además del consentimiento informado de los padres o tutores se obtuvo un asentimiento y luego se procedió a tomar la muestra de sangre, se le explicó al participante que iba a sentir un poco de dolor al momento de la extracción de la muestra de sangre debido a la aguja que penetra su piel. Se le explicó al participante que el único beneficio de este estudio es ayudar a entender un poco más aspectos sobre la enfermedad. Las muestras de los participantes fueron identificadas por códigos y sus datos colectados en la ficha epidemiológica (Apéndice A). Toda esta información se mantiene en forma confidencial, guardados cuidadosamente en archivo bajo llave en el laboratorio de Virología de la UNAH y será usada solamente para fines de esta investigación.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Generalidades de la población en estudio

Se incluyeron en el análisis a cien participantes con infección por dengue pasada o actual, definiéndose estas como dengue clásico (asintomáticos o sintomáticos) utilizados como controles y cien participantes certificados de haber padecido dengue hemorrágico grado I y II, estos considerados los casos, todos ellos fueron recolectados entre 2008 y 2009 en la ciudad Capital Tegucigalpa, Honduras. Los participantes estuvieron comprendidos entre las edades de 1 a 73 años, de estos el 62% eran jóvenes entre 11 a 30 años de edad (figura 9), el 60% de los participantes pertenecen al género femenino y el resto al masculino.

No se cuenta con información exacta de los serotipos virales que afectaron a la población del estudio, los serotipos circulantes reportados por la Secretaria de Salud durante ese periodo, fueron el DEN-1, DEN-2 y DEN- 4.

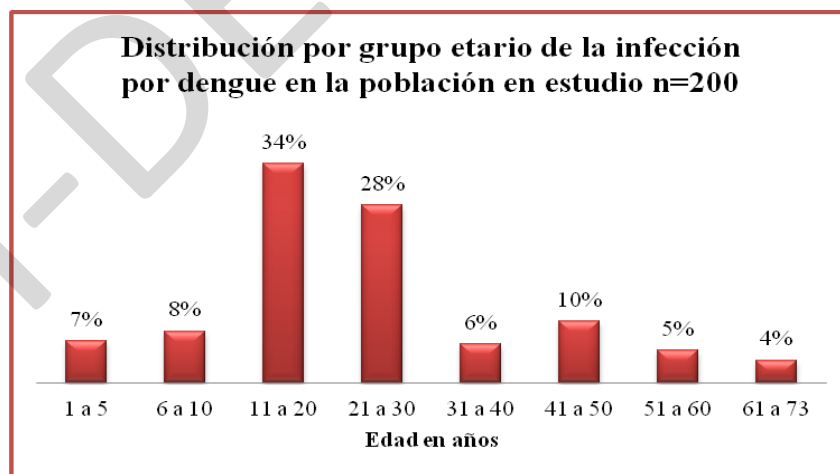


Figura 9. Distribución de la infección (DC y DH) por edad en la población en estudio (n=200).

4.2 Clasificación de la infección por Dengue

Las infecciones por dengue fueron clasificadas en primarias y secundarias por la detección de niveles de anticuerpos IgG por medio de ELISAs comerciales: IgG de captura e IgG indirecta (PanBio®, Brisbane, Australia), adicionalmente se hizo la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) que igualmente determina por otra metodología Anticuerpos IgG, para tratar de clasificar aquellas muestras que por los otros métodos resultaron indeterminadas. De acuerdo con el perfil serológico se encontró globalmente que un 78% de las infecciones eran secundarias (cuadro 3). No se observó diferencia significativa de las infecciones primarias y secundarias entre el dengue clásico y dengue hemorrágico, encontrándose frecuencias similares (figura 9). Se logró clasificar el 100% de las infecciones en primarias y secundarias.

Cuadro 3. Clasificación de las infecciones primarias y secundarias por dengue en los casos y controles.

Infecciones	No.	Porcentaje
Primarias	43	21.5
Secundarias	157	78.5
Total	200	100

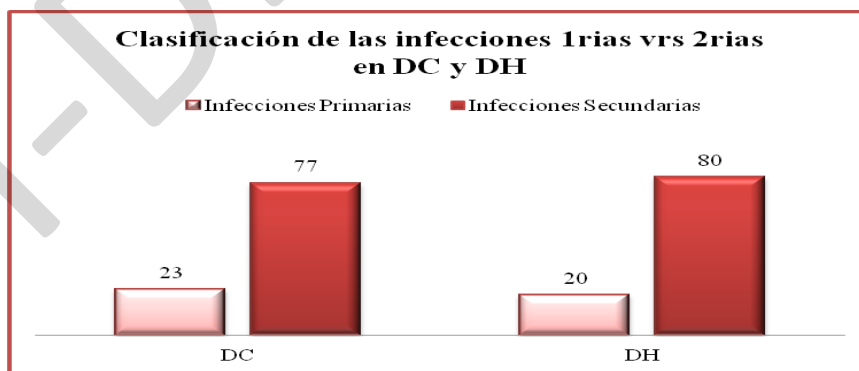


Figura 9. Distribución de las infecciones primarias y secundarias entre dengue clásico y dengue hemorrágico.

4.3 Determinación de los polimorfismos con la plataforma del SEQUENOM ¡PLEX assay process

Para el análisis de los polimorfismos por el método de ¡PLEX las muestras fueron enviadas al Centro de Tecnología de Genética Analítica (AGTC) en Toronto, Canadá. Luego se procedió al análisis de los resultados en una tabla 2x2 para *chi cuadrado*, *valor p* y *OR* utilizando el programa SPSS (versión 11.5.1) al realizar la comparación entre los casos y los controles, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 4.

4.3.1 DC-SIGN1-336

Se hizo el análisis de polimorfismo en DC-SIGN1-336 comparando los diferentes alelos entre los casos y los controles, se hizo el análisis estadístico de los genotipos GG más GA con AA, como ha sido descrito en estudios previos [Sakuntabhai et al., 2005], no se encontraron diferencias significativas entre los casos y controles ($X^2=0.82$, $p=0.36$). Así mismo también se compararon los genotipos GG con AA y GA con AA ($X^2= 0.86$, $p=0.35$ y $X^2=0.02$, $p=0.88$) sin ninguna asociación.

4.3.2 FcγRIIA-131

En el caso del polimorfismo de FcγRIIA-131, al comparar los genotipos, se observó un aumento significativo de mayor riesgo de desarrollar dengue hemorrágico (casos) en los portadores de los genotipos TC en relación al genotipo CC ($\text{Chi}^2 = 5.29$, $p = 0.02$, $OR = 2.22$).

4.3.3 VDR-352

En el análisis del polimorfismo de la variante VDR-352, se observa que el genotipo CC en comparación con el genotipo TC muestra una tendencia a aumentar en las formas severas respecto a las formas leves de la enfermedad ($\text{Chi}^2 = 3.36$, $p = 0.06$, $OR = 0.35$).

Cuadro 4. Frecuencia de los polimorfismos en los genotipos del DC-SIGN1-336, FcγRIIA-131 H/R y VDR-352, en los casos y los controles.

No.	Frecuencia de los polimorfismos			DC vs. DH		X ²	OR (95% IC)	valor p				
1	DC-SIGN											
	(A/G)			GG	GA	AA	Genotipo	GG+GA	AA	0.82	0.76 (0.42-1.37)	0.36
	DC	3	32	62	DC	35	62					
	DH	3	27	70	DH	30	70					
					Genotipo	GA	AA	0.86	0.75 (0.41-1.38)	0.35		
					DC	32	62					
					DH	27	70					
					Genotipo	GG	AA	0.02	0.89 (0.19-4.05)	0.88		
					DC	3	62					
				DH	3	70						
2	FcγRIIA (T/C)			TT	TC	CC	Genotipo	TC	CC	5.29	2.22 (1.12-4.37)	0.02
	DC	16	39	33	DC	39	33					
	DH	17	55	21	DH	55	21					
					Genotipo	TT	CC	1.33	1.67 (0.70-3.96)	0.24		
					DC	16	33					
					DH	17	21					
3	VDR (T/C)			TT	TC	CC	Genotipo	TT	CC	2.05	0.45 (0.15-1.32)	0.15
	DC	50	40	5	DC	50	5					
	DH	54	34	12	DH	54	12					
					Genotipo	TC	CC	3.36	0.35 (0.12-1.06)	0.06		
					DC	40	5					
					DH	34	12					

4.4 Determinación de los polimorfismos por PCR-RFLP

Uno de los objetivos del estudio era determinar los polimorfismos por PCR-RFLP, para compararlo con la técnica de μ PLEX. Para ello se implementó la técnica para cada una de las variantes polimórficas a investigar.

4.4.1 Variante DC-SIGN1-336.

Después de la obtención del fragmento de interés de 150pb, se procedió a la purificación de los productos con un kit de purificación comercial, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (illustra™, GE Healthcare, UK) y luego se determinaron los genotipos por medio de la digestión con la enzima de restricción MscI (cuadro 5) a través de una electroforesis en geles de agarosa obteniéndose las diferentes bandas como se muestra en la figura 3. La resolución de los resultados por PCR-RFLP fue bastante alta. Se encontró una concordancia del 100% entre las dos técnicas.

Cuadro 5. Pesos moleculares esperados en la genotipificación de la variante DC-SIGN1-336.

Genotipos	Resultados esperados
G/G	2 bandas de 131 y 19pb
G/A	3 bandas de 150, 131 y 19pb
A/A	1 banda de 150pb

Debido al pequeño peso molecular de la última banda de 19 pb, ésta no se visualiza, sin embargo se logró identificar perfectamente los tres genotipos.

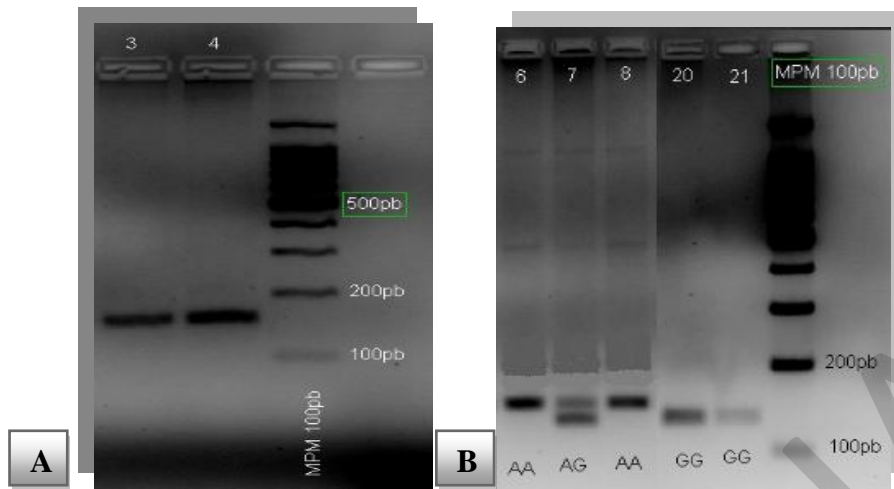


Figura 10. Polimorfismo de la variante DC-SIGN1-336, con la enzima de restricción MscI. **A:** amplificación por PCR 150pb. **B:** genotipo GG; 1 bandas de 131, genotipo GA; 2 bandas de 150, 131, genotipo AA; 1 banda de 150pb.

4.4.2 Variante *FcγRIIA-131 H/R*

Después de obtenido el fragmento de 366 pb, se procedió a realizar el corte con la enzima de restricción obteniéndose el patrón mostrado en el cuadro 6. Los resultados de la electroforesis después de la digestión con BstUI se observan en la figura 11.

Cuadro 6. Pesos moleculares esperados en la genotipificación de la variante *FcγRIIA-131 H/R*.

Genotipo	Resultados esperados
(CC) R/R	1 banda de 322pb
(TC) H/R	2 bandas de 322 y 343pb
(TT) H/H	1 banda de 343pb

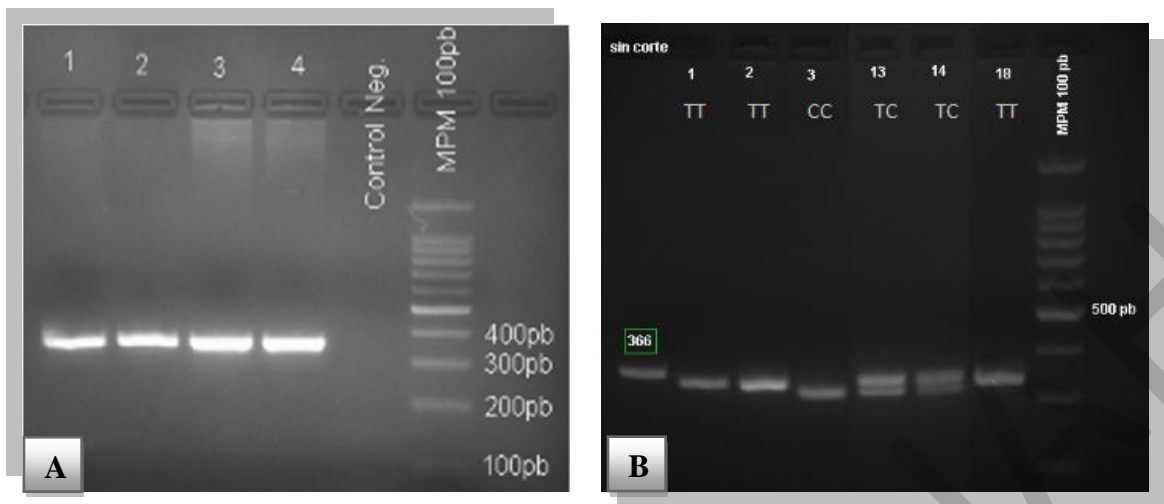


Figura 11. Polimorfismo de la variante FcγRIIA-131 H/R con la enzima de restricción BstUI. **A:** amplificación por PCR 366pb. **B** Genotipo RR (CC); 1 banda de 322pb, genotipo RH (TC); 2 bandas de 322 y 343pb, genotipo HH (TT); 1 banda de 343pb.

Para este polimorfismo se repitió el análisis en varias ocasiones sin éxito, se hizo revisión bibliográfica en el que se revela que la “pureza y concentración del ADN” es un factor importante en la técnica de RFLP, no fue hasta después del proceso de purificación de los productos de amplificación del PCR con un kit de purificación comercial, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (illustra™, GE Healthcare, UK) que se pudieron observar los resultados esperados. Se observó una concordancia del 93% en los resultados entre las dos técnicas. De acuerdo con los análisis por MassArrays en todas las muestras en las que no se encontró concordancia pertenecen al genotipo CC, pero en el RFLP se observaron como TC o TT.

4.4.3 Para la variante VDR-352

Para la variante VDR-352 el producto de amplificación esperado fue de 745pb, el cual fue digerido con la enzima de restricción Taq^qI (cuadro 7), el patrón de restricción se observa en la figura 12.

Cuadro 7. Pesos moleculares esperados en la genotipificación de la variante VDR-352.

Genotipos	Resultados esperados
T/T	2 bandas 494 y 251pb
T/C	4 bandas 494, 293, 251, 201pb.
C/C	3 bandas 293, 251, 201pb.

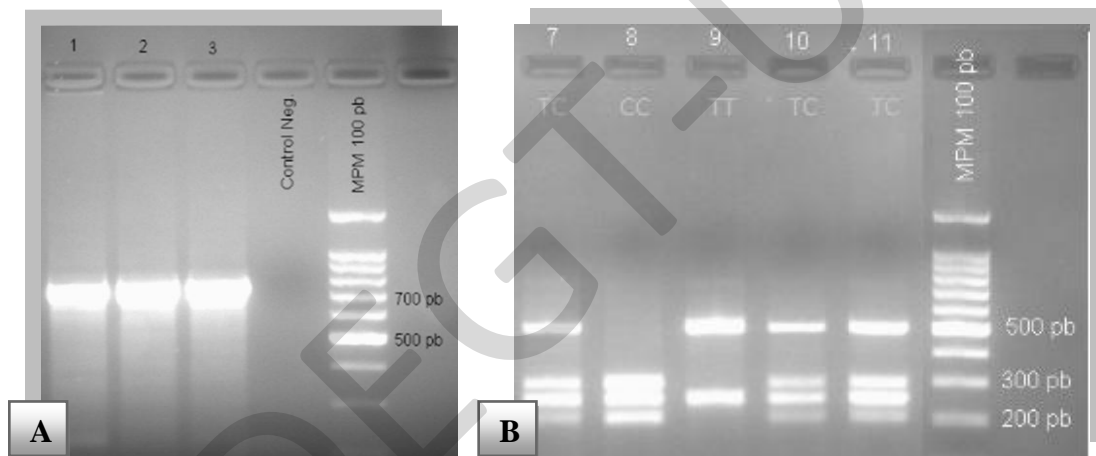


Figura 12. Polimorfismo de la variante VDR-352, con la enzima de restricción Taq^qI. **A:** amplificación por PCR 745pb. **B:** Genotipo TT 2 bandas 494 y 251pb, TC 4 bandas 494, 293, 251, 201pb, CC 3 bandas 293, 251, 201pb.

Para este polimorfismo se encontró concordancia del 100% en los resultados de las dos técnicas obteniéndose bandas de alta resolución para la diferenciación de los genotipos resultantes. Estas bandas son claramente distinguibles por medio de la técnica de RFLP implementada.

Capítulo 5. Discusión

Existen algunas hipótesis que se han propuesto para dilucidar la patogenia del dengue, entre ellas, la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), propone que las manifestaciones severas del dengue ocurren sobretodo en pacientes que cursan una infección secundaria por un serotipo de dengue diferente al de la primera infección [Halstead, 1970]. Otra hipótesis se relaciona con la capacidad antigénica del virus, y más recientemente aquella que propone que factores genéticos en el huésped predisponen o protegen del dengue severo [LaFleur et al., 2002; Loke et al., 2002; Sierra et al., 2007a].

Como primer objetivo era de nuestro interés evaluar la proporción de infecciones secundarias de nuestro estudio por considerarse a Honduras como un país endémico por dengue desde hace casi dos décadas de reporte continuo del mismo. La frecuencia global de infecciones secundarias en el estudio fue de un 78% (n=200), encontrando una frecuencia de infecciones primarias y secundarias (20-23 % y 80-77 %) en casos de DH y DC respectivamente (las cuales son muy similares). Nos orienta a pensar que no podemos atribuir los casos de DH a una mayor ocurrencia de infecciones secundarias como ha sido propuesto [Guzman et al., 1990]

Para poder tener un panorama más amplio y cumplir con el segundo objetivo, estudiamos algunos polimorfismos genéticos que previamente se han relacionado con el dengue. Uno de ellos fue el receptor DC-SING1-336 presente en células dendríticas. Estas células que son las primeras células expuestas al virus del dengue por ser residentes normales de la piel y además susceptibles a la infección por el virus del dengue [Marovich et al., 2001]. El receptor DC-SIGN puede conferir susceptibilidad al dengue en células que son

permissivas a la infección tales como células dendríticas y de Langerhans [Wu et al., 2000]. Éste receptor interactúa con fracciones de glicanos de la proteína E del virus del dengue [Pokidysheva et al., 2006] y media la entrada de los cuatro serotipos. En nuestro estudio, el alelo G de la variante del DC-SIGN1-336 no se asoció con el dengue hemorrágico, esto concuerda con otro estudio realizado en Brasil, en donde no se encontró asociación de este SNP con el dengue hemorrágico [Silva et al., 2010]. Estos datos difieren con un estudio Tailandés [Sakuntabhai et al., 2005] en donde al alelo G se le asoció significativamente con mayor riesgo de dengue hemorrágico cuando fue comparado con el dengue clásico (OR 5.88, IC 95%: 2.56 a 15.33, $P = 1.4 \times 10^{-7}$).

En el caso del receptor FcγII, es un receptor ampliamente distribuido en todas las subclases de IgG. Este puede mediar la ADA *in vitro* mediante la unión a los complejos virus-IgG [Halstead, 1970; Littaua et al., 1990]. En nuestro estudio hemos encontrado un mayor riesgo, que es estadísticamente significativo, a padecer DH en los portadores de los genotipos TC en comparación con los otros genotipos TT y CC. En un estudio realizado en Cuba [Garcia et al., 2010] se observa que portadores del genotipo TT se encuentran en mayor frecuencia en DH (51.5%) y DC (39.4%) comparado con individuos asintomáticos portadores del genotipo CC (9.1%). Esto nos conduce a pensar que poseer al menos un alelo T pudiera conferir un grado de susceptibilidad a padecer DH, en concordancia parcial con nuestro estudio.

El otro marcador analizado en nuestro estudio fue el receptor de la vitamina D (VDR). El VDR interviene en los efectos inmunoregulatorios de 1,25-hidroxivitamina D₃ (1,25 D₃), que activa los monocitos, estimulando la respuesta inmune celular, la producción de

inmunoglobulinas y la supresión de la proliferación de linfocitos [Loke et al., 2002]. La expresión de VDR puede afectar la susceptibilidad al dengue hemorrágico ya que activa los linfocitos B y T que expresen VDR y la 1,25 D3 afecta a los monocitos, el sitio principal de infección y replicación del dengue [Halstead et al., 1977]. En nuestro estudio, encontramos que al comparar las frecuencias de los genotipos CC versus TC se observa una tendencia al aumento en DH comparado con DC ($X^2 = 3.36$, $p = 0.06$ y $OR = 0.35$).

Siendo que una de las limitantes de este tipo de estudios en países en vía de desarrollo ha sido la implementación de técnicas sostenibles para la investigación y el diagnóstico de las enfermedades, en especial de aquellas que colapsan el sistema de salud en épocas epidémicas, se planteó como tercer objetivo comparar una técnica de referencia (Massarray) con la técnica de PCR-RFLP, con el fin de determinar la concordancia entre estas dos técnicas. La tecnología para el desarrollo del Massarray es sumamente costosa, además requiere de equipo especializado y sofisticado. En cambio la PCR-RFLP, ha sido una de las primeras técnicas utilizadas para determinar huellas génicas, mucho tiempo antes que las técnicas de genotipificación, y a pesar de ser una técnica bastante laboriosa, es mucho menos costosa y puede ser por ende más accesible, además posee una alta reproducibilidad, obteniéndose buenos resultados en la comparación con otras tecnologías de punta. En este estudio se obtuvo una concordancia global de los tres polimorfismos del 97.6%, posicionándola como un excelente candidato para su uso e implementación en laboratorios con requerimientos de tecnología básicos para hacer PCR.

Capítulo 6. Conclusiones

Se observó un alto porcentaje de infecciones secundarias (78%), como era de esperarse en zonas endémicas. Se encontró la frecuencia de infecciones secundarias en dengue clásico (controles) y hemorrágico (casos), prácticamente en las mismas proporciones.

De los tres marcadores analizados en este estudio se encontró una fuerte asociación con FcyRIIA-131 donde el genotipo TC se asoció con la severidad de la enfermedad. En VDR-352, el genotipo CC muestra una tendencia de susceptibilidad al dengue hemorrágico en la población de estudio. Este hallazgo debe ser estudiado más ampliamente y analizado en otras poblaciones ya que podría resultar ser útil como marcador de severidad y proporcionar información sobre grupos de riesgo.

La técnica de PCR-RFLP resultó ser una herramienta accesible y útil para la determinación de los polimorfismos de nucleótido simple, debido a su alto grado de concordancia con la prueba MassArray (97.6%). Representando un avance tecnológico puesto que no contábamos con esta técnica, la cual ha sido estandarizada y validada en nuestro laboratorio.

Capítulo 7. Recomendaciones

En estudios anteriores se ha reportado que la asociación de variantes en genes humanos y la susceptibilidad al dengue varía entre grupos étnicos [Lehrnbecher et al., 1999a]. Siendo que las etnias revelan variaciones en la frecuencia de los polimorfismos dentro y entre poblaciones, sería de interés estudiar sus frecuencias en población sana (no haber padecido dengue). En este estudio solo fue evaluada la población mestiza que es la etnia predominante en Honduras.

Es necesario explorar nuevas tecnologías que ayuden a fortalecer la investigación de las enfermedades infecciosas y que sean una alternativa para países en desarrollo. Estos esfuerzos se verán reflejados en una mejora en el abordaje de los problemas de salud que afectan año con año a la población causando incluso pérdidas de vidas humanas. Esta investigación es pionera a nivel nacional al ser los primeros en estudiar sobre marcadores genéticos en el hospedero y su asociación con el dengue severo. Adicionalmente se implementó tecnología al alcance de nuestras posibilidades, que resultó ser una excelente opción para este tipo de estudios.

Capítulo 8. Referencias

- OPS. 2010. DENGUE, Guías de atención para enfermos en la región de las Américas.
- Acosta Bas C, Gomez-Cordero I. 2005. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed* 16(2):113-137.
- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. 1999. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179(3):721-724.
- Boily-Larouche G, Zijenah LS, Mbizvo M, Ward BJ, Roger M. 2007. DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility. *Hum Immunol* 68(6):523-530.
- Brandt JT, Isenhardt CE, Osborne JM, Ahmed A, Anderson CL. 1995. On the role of platelet Fc gamma RIIa phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 74(6):1564-1572.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23):11418-11431.
- Cooke GS, Hill AV. 2001. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2(12):967-977.
- Córdova JÁ, M. H, Kuri P, Bayona M, Alpuche C, Álvarez C. 2007. Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue. In: Salud Sd, editor. Mexico. p 141.
- Dilmec F, Uzer E, Akkafa F, Kose E, van Kuilenburg AB. 2010. Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *J Diabetes Complications* 24(3):186-191.
- Figueroa EB. 1999. Dengue Clásico y Hemorrágico en Honduras. *Rev Med Hond* 67:196-200.
- Figueroa M, Pereira R, Gutiérrez H, De Mejía C, Padilla N. 1982. LA EPIDEMIA DE DENGUE EN HONDURAS, 1978-1980. *Bol OJ Simil Pmam* 93:5.

- Fried JR, Gibbons RV, Kalayanaroj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, Jarman RG, Green S, Rothman AL, Cummings DA. 2010. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3):e617.
- Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. 2009. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 2:Unit 2* 12.
- Garcia G, Sierra B, Perez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, Izquierdo A, Pupo M, Danay Diaz DR, Sanchez L, Marcheco B, Hirayama K, Guzman MG. 2010. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 82(6):1153-1156.
- Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, Jr., Srikiatkachorn A. 2007. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg* 77(5):910-913.
- Gubler DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11(3):480-496.
- Gubler DJ, Trent DW. 1993. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis* 2(6):383-393.
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. 1990. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 42(2):179-184.
- Halstead SB. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42(5):350-362.
- Halstead SB. 1979. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* 140(4):527-533.
- Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med* 146(1):218-229.

- Honduras SdSPd. 2004. Lineamientos de vigilancia y manejo estandarizado de pacientes con dengue. In: Direccion General de Salud PdPyCdD, editor. 2 ed. Tegucigalpa.
- Huang YW, Liao YT, Chen W, Chen CL, Hu JT, Liu CJ, Lai MY, Chen PJ, Chen DS, Yang SS, Kao JH. 2010. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes Immun* 11(1):87-93.
- Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE. 1996. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 199(1):55-59.
- Kurane I. 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30(5-6):329-340.
- LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, Hernandez-Pacheco G, Cutino-Moguel T, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C. 2002. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 63(11):1039-1044.
- Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5):e646.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(3):545-551.
- Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. 1999a. Variant genotypes of the low-affinity Fc gamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc gamma receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood* 94(12):4220-4232.
- Lehrnbecher T, Venzon D, de Haas M, Chanock SJ, Kuhl J. 1999b. Assessment of measuring circulating levels of interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III, and mannose-binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin Infect Dis* 29(2):414-419.
- Lindenbach BD, Rice CM. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59:23-61.

- Littaua R, Kurane I, Ennis FA. 1990. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 144(8):3183-3186.
- Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg* 67(1):102-106.
- Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, Day NP, Farrar J, Hill AV. 2001. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis* 184(11):1369-1373.
- Lopez M, Mallorquin P, Vega M. 2002. Microarrays y biochips de ADN. In: *Proteómica FEpeDdlIeGy*, editor. Madrid.
- MacDonald PN, Dowd DR, Haussler MR. 1994. New insight into the structure and functions of the vitamin D receptor. *Semin Nephrol* 14(2):101-118.
- Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, Putvatana R, Murphy G, Tassaneetrithep B, Burgess T, Birx D, Hayes C, Schlesinger-Frankel S, Mascola J. 2001. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6(3):219-224.
- Mattingly PF. 1967. Taxonomy of *Aedes aegypti* and related species. *Bull Wld Hlth Org* 36:552-554.
- Olesen R, Wejse C, Velez DR, Bisseye C, Sodemann M, Aaby P, Rabna P, Worwui A, Chapman H, Diatta M, Adegbola RA, Hill PC, Ostergaard L, Williams SM, Sirugo G. 2007. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun* 8(6):456-467.
- OPS. 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control.
- Platonov AE, Shipulin GA, Vershinina IV, Dankert J, van de Winkel JG, Kuijper EJ. 1998. Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 27(4):746-750.

- Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124(3):485-493.
- Rigau-Perez JG, Gubler DJ, Vorndam AV, Clark GG. 1994. Dengue surveillance--United States, 1986-1992. *MMWR CDC Surveill Summ* 43(2):7-19.
- Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, Guzman MG. 1998. [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica* 4(1):1-5.
- Rosen L. 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26(3):337-343.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179(1):187-191.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Despres P, Julier C. 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37(5):507-513.
- Sanders LA, van de Winkel JG, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Capel PJ, Zegers BJ. 1994. Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis* 170(4):854-861.
- Selvaraj P, Alagarasu K, Swaminathan S, Harishankar M, Narendran G. 2009. CD209 gene polymorphisms in South Indian HIV and HIV-TB patients. *Infect Genet Evol* 9(2):256-262.
- Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, Aguirre E, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Valdes L, Kanki P, Guzman MG. 2007a. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 68(6):531-540.

- Sierra B, Kouri G, Guzman MG. 2007b. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 152(3):533-542.
- Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, Dias JP, Castro JM, Vasconcelos PF, Goddard KA, Barreto ML, Reis MG, Teixeira MG. 2010. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet* 18(11):1221-1227.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197(7):823-829.
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338(2):143-156.
- Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 72:1-76.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181(1):2-9.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 354(9188):1431-1434.
- WHO. 2009a. Situacion del dengue en las americas en el 2009.
- WHO WHO. 2009b. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117
- WHO WHO. 2009c. DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL.
- Wilder-Smith A, Gubler DJ. 2008. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* 92(6):1377-1390, x.
- Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN. 2000. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355(9204):618-621.

- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6(7):816-820.
- Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, Vasudevan SG, Lescar J. 2005. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J Virol* 79(16):10278-10288.

Apéndices

- A. Ficha epidemiológica del dengue
- B. Carta de Invitación para participar en el estudio de investigación
- C. Consentimiento informado para participar como voluntario en el estudio de investigación
- D. Consentimiento informado para los padres o guardianes
- E. Aprobación de ética del estudio.

Apéndice A Ficha epidemiología del dengue

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL DENGUE
SOLICITUD DE EXÁMENES

SÓSPÉCHOSO DE DENGUE HEMORRÁGICO SI NO

NOMBRE COMPLETO DEL PACIENTE _____ EDAD _____ SEXO _____

NOMBRE DEL JEFE DE FAMILIA _____

DIRECCIÓN EXACTA: LUGAR _____ MUNICIPIO _____

DEPARTAMENTO _____ BARRIO O COLONIA _____

CALLE O AVENIDA _____ CASA _____ TEL _____

HOSPITALIZADO EN _____ SALA _____ No EXPEDIENTE _____

DATOS CLÍNICOS: FECHA PRIMER SINTOMA _____ DÍAS DE EVOLUCIÓN _____

FECHA DE TOMA DE MUESTRA 1ra _____ 2da _____

TIPO DE MUESTRA SUEÑO SANGRE EN DISCO

No	SINTOMAS	SI	NO
1	FIEBRE		
2	DOLORES DE CABEZA		
3	DOLORES DE LOS OJOS		
4	DOLORES DE CUERPO		
5	DOLORES DE CAYUNTURAS		
6	ERUPCIÓN		
7	NAUSEAS O VOMITOS		
8	FALTA DE APETITO		
9	ESCOLOFRIOS		
10	TOS		
11	CONGESTION NASAL		
12	PETEQUIAS/SQUIMOSIS		
13	VOMITO CON SANGRE		
14	SANGRE EN LA ESCRETA		
15	HEMORRAGIAS DE NARIZ		
16	HEMORRAGIAS DE ENCIMAS		
17	SANGRE EN LA ORINA		
18	HEMOVAC/VULM/		
19	DOLORES ABDOMINAL		
20	FRIALDAD DE MIEMBROS		
21	SUDORACION		
22	PALIDEZ		
23	PRUEBA TOMNQUETE (H) (-)		
24	DERRAME DE SEROSAS		

PRUEBA DE LAB.	FECHA Día/Mes/Año	FECHA Día/Mes/Año	FECHA Día/Mes/Año
HE			
HTC			
PLAQUETAS			
LEUCOCITOS			

Enviar resultado a: _____

DATOS ADICIONALES:

1. Durante los 10 días antes de enfermarse viajó a otro lugar SI _____ NO _____

2. ¿A dónde viajó? _____

3. ¿Tuvo dengue antes? SI _____ NO _____

Otros diagnósticos _____

INFORMACION SOBRE TOMA DE MUESTRAS
Al momento primer contacto paciente

- 1ra Muestra: suero sanguíneo (estéril)
examen:
Aislamiento de virus.
Primeros 5 días de inicio de síntomas
- 2da Muestra: suero o sangre en papel filtro
Examen: IgG-IgM, tomada cuando la primera muestra fue recolectada antes del sexto día de la fecha de inicio de los síntomas.
- En caso de sospecha de dengue hemorrágico tomar obligatoriamente 2 muestras.

DENGUE HEMORRÁGICO A C

B D

CONDICIONES DE SOBRESOS V M

Ponencia que remitió _____

Reg. salud _____ área _____

M.P.S. _____ Tel _____

Lugar de Trabajo/
Estudio _____

Tel/trabajo/ estudio _____

Apéndice B

CARTA DE INVITACION PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE
INVESTIGACION

Infección con el virus del Dengue y su asociación con factores genéticos del huésped

Investigadores Principales:

Dr. Filemón Bucardo; Departamento de Microbiología, Universidad de León, Nicaragua

Dra. Ivette Lorenzana de Rivera; Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Profesor Lennart Svensson; Laboratorio de Virología Molecular de la Universidad de Linköping, Suecia.

Colaboradores:

Dra. Cynthia Rodríguez, Departamento de Microbiología, UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

Dr. Armando Matute. Hospital de León. Nicaragua.

Dr. Walter Moncada. Instituto Hondureño de Seguridad Social. IHSS. Tegucigalpa, Honduras.

PARA PROTEGER LOS DERECHOS Y EL BIENESTAR DE LAS PERSONAS QUE PODRIAN PARTICIPAR, ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACION HA SIDO APROBADO POR LOS COMITES REVISORES PARA LA ETICA EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS UNIVERSIDADES DE LEON EN NICARAGUA Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS.

El estudio de investigación llamado “**Infección con el virus del Dengue y su asociación con factores genéticos del huésped**” es un pequeño proyecto de investigación que se está haciendo entre dos universidades: en Nicaragua, y en Honduras. Investigadores de estas instituciones están muy interesados en ayudar a tener un mejor entendimiento y tomar acciones que puedan beneficiar tanto al mundo como a países Centroamericanos, a abordar sus problemas de salud.

¿QUÉ ES DENGUE?

Dengue es una infección causada por un virus y existe en muchos países localizados en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Dengue abunda en áreas urbanas y semi-urbanas. En los países donde hay Dengue, por ejemplo Honduras, el virus del Dengue causa infecciones que muchas veces pueden ser silenciosas (sin síntomas). Otras veces la infección pueden ser muy suave, solo con fiebre y algunos otros síntomas, y a veces puede ser muy seria con hemorragia y a veces puede ser fatal.

No se entiende muy bien por qué a algunas personas sólo les da fiebre de Dengue mientras que a otras les da Dengue Hemorrágico. El Dengue es transmitido por mosquitos que se crían dentro y alrededor de los hogares. Si un mosquito pica a una

persona que tenga el virus del Dengue en su sangre, el mosquito se infecta y puede transmitir el virus de Dengue a otra persona cuando vuelva a picar.

Hay cuatro tipos del virus del Dengue. A una persona le puede dar Dengue cada vez que le pica un mosquito que porta un diferente tipo de virus.

¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

El propósito de este estudio de investigación es ayudar a los investigadores a tener un mejor conocimiento del Dengue.

¿COMO FUI SELECCIONADO PARA ESTE ESTUDIO?

A través de la información provista por su médico tratante en el que indica que Ud. presenta o presento síntomas relacionados con el dengue clásico y/o hemorrágico fue seleccionado para participar en este estudio. Las personas que accedan a participar van a hacer lo siguiente: Primero van a responder verbalmente a preguntas sobre su interés de participar en el estudio, luego obtendremos con su consentimiento una copia de la ficha de Dengue (Apéndice 1)

En caso de un menor de edad en cuyo caso va a ser el padre o guardián quien va a dar respuestas por él o por ella.

Además cada participante va a dejarse sacar una pequeña muestra de sangre de la vena del brazo, la cual vamos a recolectar en un tubo de ensayo usando equipo completamente nuevo y estéril. Una muestra de una cucharadita y media (7 ml) de sangre de los adultos y de los niños menores de 2 años, 1/3 de cucharadita (3.5 ml) de sangre para las pruebas serológicas en los momentos de muestreo.

ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CONLLEVA UN “RIESGO MÍNIMO”

Ya que necesitamos tomar muestras de sangre de usted, este estudio se llama de “Riesgo Mínimo” (o sea de riesgo físico muy pequeño) porque usted puede sentirse nervioso debido a la extracción de la sangre y porque le va a doler un poco cuando se le saque la sangre debido a la aguja que penetra su piel. Una vez que se le tome la sangre, usted puede tener un poco de incomodidad, enrojecimiento, o tal vez un morete en el sitio donde se le sacó la sangre. También, muy raramente se puede producir una pequeña infección en el sitio donde se le sacó la sangre. Todos estos riesgos son muy mínimos o son muy remotos y nosotros vamos a tomar todos los pasos necesarios para que usted sepa qué hacer antes, durante, y después de que le extraigamos la muestra de sangre. El personal que va extraer las muestras de sangre tiene amplia experiencia en hacer este procedimiento. Además usted no debe preocuparse de que se le puede causar una infección porque todo los materiales y equipo que usemos son nuevos y totalmente estériles, sin ninguna contaminación.

¿QUÉ SE LE VA A HACER A LAS MUESTRAS DE SANGRE?

Su sangre va a ser usada para estudiar Dengue y nada más que Dengue. Estas pequeñas cantidades de sangre no tienen ningún valor comercial y no pueden ser vendidas, ni pueden ser usadas para nada más que para estudios de laboratorio. Su sangre va a ser tratada con todo respeto y confidencialidad y cuando se terminen de hacer las pruebas, va a ser descartada en el laboratorio de una manera muy apropiada y respetuosa.

PROTECCIÓN DE LA CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN, MUESTRAS DE SANGRE Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

Toda información personal y médica que se obtenga o produzca en este estudio de investigación es estrictamente confidencial. Se va a respetar su privacidad y en todo momento y su identidad nunca va a ser revelada o compartida con personas ajenas al estudio a menos que usted haya dado su autorización de compartirla con su médico. Toda su información, sus muestras y sus análisis estarán guardados en lugares seguros y protegidos de personas no autorizadas.

El estudio requiere de algunas pruebas de laboratorio que se llevaran a cabo fuera del país en etapas subsiguientes de la investigación.

MUCHAS GRACIAS POR SU TIEMPO!

Nota para el Comité de Ética:

La información escrita en esta carta de invitación va a ser discutida y explicada verbalmente nivel en un lenguaje sencillo y apropiado a la escolaridad y edad del participante. A cada participante o sus encargados en caso de ser menores de edad que aún no sepan leer se le dará una copia de esta carta.

Apéndice C

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR COMO VOLUNTARIO
EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION**

Infección con el virus del Dengue y su asociación con factores genéticos del huésped

Investigadores Principales:

Dr. Filemón Burcado; Departamento de Microbiología, Universidad de León, Nicaragua

Dra. Ivette Lorenzana de Rivera; Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Profesor Lennart Svensson; Laboratorio de Virología Molecular de la Universidad de Linköping, Suecia.

Colaboradores:

Dra. Cynthia Rodríguez, Departamento de Microbiología, UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

Dr. Armando Matute. Hospital de León. Nicaragua.

Dr. Walter Moncada. Instituto Hondureño de Seguridad Social. IHSS. Tegucigalpa, Honduras.

PARA PROTEGER LOS DERECHOS Y EL BIENESTAR DE LAS PERSONAS QUE PODRÍAN PARTICIPAR, ESTE ESTUDIO HA SIDO APROBADO POR LOS COMITÉS REVISORES PARA LA ÉTICA EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS UNIVERSIDADES DE LEÓN EN NICARAGUA LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Nombre del Participante: _____

Código: _____

Entiendo que yo y/o mi hijo(a) menor de edad hemos sido invitados a participar en el estudio de investigación titulado “**Infección con el virus del Dengue y su asociación con factores genéticos del huésped**”. Yo doy testimonio que los entrevistadores que están visitando mi casa me han explicado en detalle todos los aspectos del estudio en forma verbal y escrita en la carta de invitación del estudio arriba mencionado.

Yo aquí doy testimonio que he aceptado esta invitación a participar en el estudio y/o he aceptado en nombre de mi hijo(a) menor, quien también ha expresado su deseo de participar en el estudio. Yo he tomado esta decisión basado en la información que he recibido y/o leído. Yo he tenido la oportunidad de recibir los detalles adicionales que he querido sobre el estudio y entiendo que puedo hacer preguntas en el futuro.

Yo entiendo que mi participación es LIBRE Y VOLUNTARIA; yo entiendo que las muestras de sangre serán tomadas por técnicos de la salud entrenados, con todas las

precauciones necesarias y que sentiré un dolor pasajero en el sitio donde pincharon mi brazo.

Yo doy testimonio que estoy informado de la cantidad de sangre que voy a dar es una cucharadita y media (alrededor de 7 ml): me han mostrado un tubo de ensayo con similar cantidad de sangre que voy a dar.

Yo entiendo que mis muestras de sangre serán analizadas en Honduras y Nicaragua, y que estudio requiere de algunas pruebas de laboratorio que se llevaran a cabo fuera del país en etapas subsiguientes de la investigación (Suecia y Canadá).

Yo entiendo que toda esta información se mantendrá confidencial y será usada solamente para fines de esta investigación.

Yo entiendo que si tengo más preguntas sobre el estudio, puedo contactar en Honduras a la Dra. Ivette Lorenzana de Rivera llamado al número de teléfono: 232-5836 o visitándola en el Departamento de Microbiología, UNAH localizado en el Edificio CB 4to piso, Boulevard Suyapa, Tegucigalpa.

Yo entiendo que recibiré una copia firmada del formato de consentimiento para mi propio registro.

Yo _____ aquí autorizo la divulgación de la información de mis registros médicos a los investigadores que hacen parte del estudio “**Factores genéticos del huésped en casos de dengue**” para el propósito de la investigación.

Yo he leído y entendido la información contenida en éste documento.

Yo acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación.

Nombre del Participante	Firma del Participante	Fecha
Persona Autorizada que Acepta la Participación	Firma de la Persona Autorizada que Acepta la Participación	Fecha

Apéndice D

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
LOS PADRES O GUARDIANES**

“Infección con el virus del Dengue y su asociación con factores genéticos del huésped”

Investigadores Principales:**Dr. Filemón Bucardo;** Departamento de Microbiología, Universidad de León, Nicaragua**Dra. Ivette Lorenzana de Rivera;** Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.**Profesor Lennart Svensson;** Laboratorio de Virología Molecular de la Universidad de Linköping, Suecia.**Colaboradores:****Dra. Cynthia Rodríguez,** Departamento de Microbiología, UNAH. Tegucigalpa, Honduras.**Dr. Armando Matute.** Hospital de León. Nicaragua.**Dr. Walter Moncada.** Instituto Hondureño de Seguridad Social. IHSS. Tegucigalpa, Honduras.

Yo entiendo que mi hijo(a)/hijos(as) han dado su consentimiento para participar en este estudio y acepto que mis hijos(a) pueden participar. Yo entiendo que se les tomarán muestras de sangre para el estudio de Dengue.

Yo entiendo que recibiré una copia firmada de este documento.

Yo aquí confirmo que mi hijo(a) o mis hijos(as) pueden participar Contestando preguntas/dando información relacionada con el estudio

Nombre del Niño(a)	Edad
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Nombre del Padre o Guardián

Firma del Padre o Guardián

Fecha: _____ DD/MM/AA

Apéndice E Aprobación del comité de ética.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIDAD DE INVESTIGACION CIENTIFICA
COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION BIOMEDICA



CONFIDENCIAL
CONSTANCIA

Por este medio El Comité de Ética en investigación biomédica (CEIB), de la Unidad de Investigación Científica (UIC), con Registro N° IRB 00003070 hace CONSTAR que el proyecto de investigación:

"Infección con el virus del dengue y su asociación con factores genéticos del huésped en nicaragüenses y hondureños".

Presentado por: Dra. Ivette Lorenzana de Rivera

Investigadores Principales: Dr. Filemon Burcado, Dra. Ivette Lorenzana de Rivera, Profesor Lennart Svensson.

Colaboradores: Dra. Cynthia Rodriguez, Dr. Armando Matute, Dr. Walter Moncada.

Institución (es): Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Institución (es) que le brinda(n) apoyo: Departamento de Microbiología de la Universidad de León, Nicaragua, Laboratorio de Virología Molecular de la Universidad de Linköping, Suecia.

Fue sometido a un proceso de revisión y análisis por el pleno de los miembros del comité quedando dicho protocolo en calidad de:



APROBADO

Conforme a las Normas Éticas Nacionales e Internacionales Vigentes.

Para los fines que al interesado (a) convalida se extiende la presente a los 02 días del mes de Febrero del 2009.

Dr. Dennis Padgett Moncada
Coordinador CEIB-UIC



Dr. Iván Espinoza Salvadó
Secretario CEIB-UIC

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
Facultad de Ciencias
Escuela de Microbiología
Sección de Virología

Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas

Procedimiento Operativo Estándar Para:

***Factores Genéticos e Inmunológicos del Huésped
Asociados con el Dengue en Tegucigalpa,
Honduras***

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Dra. Cynthia Rodríguez Febrero de 2011	Dra. Ivette Lorenzana de Rivera Marzo de 2011	Dra. Ada Zelaya Marzo de 2011

Tegucigalpa, Honduras, 2011

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

I. Objetivo

Asegurarse de poseer las metodologías para el desarrollo de los procedimientos realizados en la sección de Virología para el estudio de investigación de tesis “Asociación de Factores Genéticos e Inmunológicos del Huésped con el Dengue en Tegucigalpa, Honduras”

II. Alcance

Se aplica a todas las actividades del laboratorio de virología que se relacionan con el análisis de muestras humanas para diagnóstico serológico y molecular de dengue que tienen incidencia en el sistema de calidad y que por su importancia requieran una descripción escrita

III. Responsabilidades

Personal de la sección de virología encargado de la redacción, revisión, aprobación, distribución y control de documentos.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

IV. Contenido

Procedimientos Operativos Estándar para técnicas de análisis

1. Toma de muestras sanguíneas
2. Transporte de muestras sanguíneas
3. Mantenimiento de muestras
4. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs)
 - a. ELISA de Captura IgM Dengue
 - b. ELISA de Captura IgG Dengue
 - c. ELISA Indirecta IgG Dengue
 - d. Dengue Early ELISA
 - e. Para MAC-ELISA Honduras
5. Extracción de Ácidos Nucleicos
 - a. Extracción de ARN
 - b. Extracción de ADN
6. Medición de Ácidos Nucleicos
7. Separación de Linfocitos
8. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR)
9. Electroforesis en geles de agarosa
10. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)
 - a. Receptor DC-SIGN1-336
 - b. Receptor FcγRIIA H/R-131
 - c. Receptor de Vitamina D-352
11. Almacenamiento y embalaje de muestras para envío en hielo seco

Procedimientos Operativos Estándar para uso de equipo de laboratorio

1. El uso del Termociclador
2. Uso del Lavador de Placas
3. Uso del Lector de ELISA
4. Uso del Esterilizador a Vapor de Alta Presión
5. Uso de la Cabina de Trabajo
6. Uso de la Balanza

Procedimiento Operativos Estándar para Lavado y Descarte de Material

1. Lavado de Material reusable
2. Descarte de material Infeccioso
3. Tratamiento de derrames en el Laboratorio

V. Anexos

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Toma de Muestras Sanguíneas Con Vacutainer Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 4 de 1

Materiales

1. Algodón con alcohol al 70%.
2. Torniquete de 25 a 30 cm de largo
3. Camisa vacutainer
4. Jeringas para vacutainer
5. Tubos para toma de muestra con o sin anticoagulante
6. Marcador para rotulación de los tubos de muestra

Obtención de la muestra

1. Verificar que los elementos por utilizar estén listos y que el paciente se sienta cómodo.
2. Aplicar el torniquete aproximadamente cuatro dedos por encima de la flexión del codo o a 10 cm del codo, sujetar con un medio nudo
3. Limpiar la zona con alcohol al 70% o alcohol yodado, en un área de 2 pulgadas
4. El paciente deberá abrir y cerrar la mano durante unos segundos y después la mantendrá cerrada, esto ayudará a visualizar las venas superficiales
5. Se retira el estuche protector de la aguja y se coloca en la camisa vacutainer y se procede a realizar la punción de la vena de tal manera que el bisel se encuentre hacia arriba. Se coloca la aguja en dirección paralela a la vena, se perfora la piel haciendo avanzar la aguja 0,5-1 cm en el tejido subcutáneo, luego se perfora la vena
6. Se coloca el tubo con vacío dentro de la camisa vacutainer hasta que la parte posterior de la aguja perfora la goma del tubo y se deja llenar de sangre hasta el volumen requerido. Si desea extraer más de un tubo de sangre se retira el tubo y se coloca el siguiente sin retirar la aguja de la vena.
7. Al terminar retirar el torniquete e indicar al paciente que deje de hacer puño. Se coloca el algodón seco encima de la punción y se retira la aguja.
8. Agitar el tubo suavemente para homogeneizar la muestra con el anticoagulante, para los tubos sin anticoagulante dejar en reposo en forma vertical en una gradilla.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Nota: Es importante que se rotulen los tubos adecuadamente con nombre o código del paciente, edad, genero y fecha de la toma de muestra.

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Transporte de muestras sanguíneas Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Puntos a considerar

- Para evitar confusiones es necesario que las muestras se encuentren bien rotuladas antes, durante y después del transporte
- Asegurarse que los tubos con sangre estén bien cerrados para evitar derrames

Transporte de muestras

1. Colocar las muestras sanguíneas con o sin anticoagulante en gradillas dentro de una hielera a una temperatura de 4°C de forma vertical.
2. Transportar las muestras lo mas pronto posible al laboratorio de Virología de la UNAH

Recomendaciones

- En caso de no poder enviar las muestras al laboratorio inmediatamente, guardar las muestras en refrigeración (4-8°C) por no mas de 24 horas después de haberla captado.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Mantenimiento de Muestras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Para el uso posterior de las muestras estas deberán guardarse de la siguiente manera:

1. Muestras de **suero**

Estas deberán colocarse en viales criogénicos rotuladas correctamente, depositadas en cajas con la respectiva rotulación y ser guardadas a -20°C en los congeladores horizontales de la Sección de Virología, de la Escuela de Microbiología

2. Muestras de **plasma**

Estas deberán colocarse en viales criogénicos rotuladas correctamente, de manera aséptica, depositadas en cajas con la respectiva rotulación y ser guardadas a -80°C en los congeladores verticales de la Sección de Virología, de la Escuela de Microbiología

3. Para células sanguíneas **Linfocitos y Buffy coat**

Estas deberán colocarse en viales criogénicos rotuladas correctamente, de manera aséptica, depositadas en cajas con la respectiva rotulación y ser guardadas a -80°C en los congeladores verticales de la Sección de Virología, de la Escuela de Microbiología

Nota:

El rotulo deberá llevar el numero o código de la muestra, el tipo de muestra ya sea plasma, suero, linfocitos o buffy coat; esto deberá estar registrado en una base de datos.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA de Captura IgM Dengue E-DEN01M PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Preparación de reactivos

1. Buffer de Lavado 20X: 1 ml del buffer de lavado + 19 ml de agua destilada. Duración 1 semana a TA. Si la solución 20X tiene formación de cristales por el frío, incubar a 37 °C durante unos minutos para eliminar los cristales
2. Controles positivo y negativo; calibrador y muestras: dilución 1:100:
 La dilución puede ser de dos maneras:
 - ✓ 1000 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero
 - ✓ 90 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero (dil 1:10). Tomar 20 ul del suero diluido y agregarlo a 180 ul de diluyente de muestra
 Se utilizan 1C+, 1C- y 3 calibradores
3. Tetrametilbenzidina (TMB): listo para su uso
4. Solución de parada Acido Fosfórico 1M: listo para su uso. Estable a TA hasta su expiración

Procedimiento

1. Hacer la dilución 1:100 de los sueros, controles y calibradores
2. Agregar a la placa 100 ul de las muestras y controles diluidos a la placa e incubar 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
3. Hacer una dilución 1:250 del antígeno en el diluyente de antígeno
4. Preparar la mezcla de volúmenes iguales del conjugado con el antígeno diluido (serán utilizados 100 ul por pocito) e incubar a TA hasta que sea requerido (1 hr)
5. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
6. Agregar 100 ul de la mezcla Conjugado HRP-Anticuerpo a toda la placa
7. Incubar la placa 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
8. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
9. Agregar 100 ul de sustrato TMB a toda la placa, incubar 10 min a TA

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

10. Agregar 100 ul de solución de parada

11. Leer a 450 nm con filtro de referencia 600-650 nm y blanco de aire, antes de 30 minutos

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA de Captura IgM Dengue E-DEN01M PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Calculo de resultados:

1. Calcular el punto de corte:

Es la media de la absorbancia de los tres calibradores

2. Calcular el valor índice:

Valor índice = abs de la muestra/punto de corte

3. Calcular las unidades PANBIO: Unidades PANBIO = Valor índice x 10

Interpretación de resultados:

Valor índice	Unidades PANBIO	Resultado
< 0.9	< 9	Negativo
0.9-1.1	9-11	Equivoco (repetir)
> 1.1	> 11	Positivo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA de Captura IgG Dengue E-DEN02G PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Preparación de reactivos

1. Buffer de Lavado 20X: 1 ml del buffer de lavado + 19 ml de agua destilada. Duración 1 semana a TA. Si la solución 20X tiene formación de cristales por el frío, incubar a 37 °C durante unos minutos para eliminar los cristales
2. Antígeno de Dengue 1, 2, 3 y 4: los antígenos liofilizados se almacenan de 2-8 °C; una vez reconstituidos deben congelarse
Cada vial de antígeno es suficiente para 16 pocitos. Cada vial se reconstituye con 1 ml del buffer de antígeno, mezclar suavemente hasta que se disuelva. El antígeno reconstituido que no se utilice debe ser guardado a -80° C
3. Controles positivo y negativo; calibrador y muestras: dilución 1:100:
La dilución puede ser de dos maneras:
 - ✓ 1000 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero
 - ✓ 90 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero (dil 1:10). Tomar 20 ul del suero diluido y agregarlo a 180 ul de diluyente de muestra. Se utilizan 1C+, 1C- y 3 calibradores.
4. Anti IgG monoclonal conjugada con HRP: listo para su uso
5. Tetrametilbenzidina (TMB): listo para su uso
6. Solución de parada Acido Fosfórico 1M: listo para su uso. Estable a TA hasta su expiración

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA de Captura IgG Dengue E-DEN02G PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Procedimiento

1. Hacer la dilución 1:100 de los sueros, controles y calibradores
2. Agregar a la placa 100 ul de las muestras y controles diluidos a la placa e incubar 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
3. Preparar la mezcla de volúmenes iguales del conjugado con el antígeno reconstituido (serán utilizados 100 ul por pocito)e incubar a TA hasta que sea requerido (1 hr)
4. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
5. Agregar 100 ul de la mezcla Conjugado HRP-Anticuerpo a toda la placa
6. Incubar la placa 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
7. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
8. Agregar 100 ul de substrato TMB a toda la placa, incubar 10 min a TA
9. Agregar 100 ul de solución de parada
10. Leer a 450 nm con filtro de referencia 600-650 nm y blanco de aire, antes de 30 minutos

Calculo de resultados:

1. Calcular el Punto de corte: Es la media de la absorbancia de los tres calibradores
2. Calcular las unidades PANBIO: dividiendo la OD de la muestra entre punto de corte y multiplicar el resultado de la división por 10

Interpretación de resultados:

Unidades PANBIO	Resultado	Interpretación
< 18	Negativo	No hay evidencia de infección secundaria. Analizar otra muestra 4-7 días después
18-22	Equivoco (repetir)	Las muestras deben analizarse de nuevo
> 22	Positivo	Sugiere infección secundaria por dengue

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA Indirecta IgG Dengue E-DEN02G PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Preparación de reactivos

1. Buffer de Lavado 20X: 1 ml del buffer de lavado + 19 ml de agua destilada. Duración 1 semana a TA. Si la solución 20X tiene formación de cristales por el frío, incubar a 37 °C durante unos minutos para eliminar los cristales.
2. Controles positivo y negativo; calibrador y muestras: dilución 1:100:
La dilución puede ser de dos maneras:
 - ✓ 1000 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero
 - ✓ 90 ul de diluyente de muestras + 10 ul de suero (dil 1:10). Tomar 20 ul del suero diluido y agregarlo a 180 ul de diluyente de muestra. Se utilizan 1C+, 1C- y 3 calibradores.
3. Tetrametilbenzidina (TMB): listo para su uso
4. Solución de parada Acido Fosfórico 1M: listo para su uso. Estable a TA hasta su expiración

Procedimiento

1. Hacer la dilución 1:100 de los sueros, controles y calibradores
2. Agregar a la placa 100 ul de las muestras y controles diluidos a la placa e incubar 30 min. a 37 °C en cámara húmeda
3. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
4. Agregar 100 ul de la mezcla Conjugado HRP-Anticuerpo a toda la placa
5. Incubar la placa 30 min. a 37 °C en cámara húmeda
6. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
7. Agregar 100 ul de substrato TMB a toda la placa, incubar 10 min a TA
8. Agregar 100 ul de solución de parada
9. Leer a 450 nm con filtro de referencia 600-650 nm y blanco de aire, antes de 30 minutos

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para ELISA Indirecta IgG Dengue E-DEN02G PANBIO Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Calculo de resultados:

1. Calcular el Punto de corte:

Es la media de la absorbancia de los tres calibradores X factor de calibración 0.62

2. Calcular el valor índice:

Valor índice = abs de la muestra/punto de corte

3. Calcular las unidades PANBIO: Unidades PANBIO = Valor índice x 10

Interpretación de resultados:

Valor índice	Unidades PANBIO	Resultado
< 0.9	< 9	Negativo
0.9-1.1	9-11	Equivoco (repetir)
> 1.1	> 11	Positivo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Dengue Early ELISA E-DENO2P PANBIO Anti NS1 Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Preparación de reactivos

1. Buffer de Lavado 20X: 1 ml del buffer de lavado + 19 ml de agua destilada. Duración 1 semana a TA. Si la solución 20X tiene formación de cristales por el frío, incubar a 37 °C durante unos minutos para eliminar los cristales.
2. Controles positivo y negativo; calibrador y muestras: dilución 1:1
Agregar 75ul de diluyente y 75ul de muestra, controles y calibrador (por triplicado)
3. Anti IgM Humana conjugada con HRP: listo para su uso
4. Tetrametilbenzidina (TMB): listo para su uso
5. Solución de parada Acido Fosfórico 1M: listo para su uso. Estable a TA hasta su expiración

Procedimiento

1. Hacer la dilución 1:1 de los sueros, controles y calibradores
2. Agregar a la placa 100 ul de las muestras y controles diluidos a la placa, cubrirla e incubar 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
3. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
4. Agregar 100 ul del Conjugado HRP-Anti NS1 MAb a toda la placa
5. Cubrir la placa e incubar la placa 1 hora a 37 °C en cámara húmeda
6. Lavar la placa 6X con el buffer de lavado
7. Agregar 100 ul de sustrato TMB a toda la placa, incubar 10 min a TA
8. Agregar 100 ul de solución de parada
9. Leer a 450 nm con filtro de referencia 600-650 nm, sin blanco de lectura, antes de 30 minutos

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Dengue Early ELISA E-DENO2P PANBIO Anti NS1 Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Calculo de resultados:

1. Calcular el Punto de corte:

Es la media de la absorvancia de los tres calibradores por 0.62 (factor de calibración)

2. Calcular el valor índice:

Valor índice = abs de la muestra/punto de corte

3. Calcular las unidades PANBIO: Unidades PANBIO = Valor índice x 10

Interpretación de resultados:

Valor índice	Unidades PANBIO	Resultado
< 0.9	< 9	Negativo
0.9-1.1	9-11	Equivoco (repetir)
> 1.1	> 11	Positivo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Para MAC-ELISA Honduras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Procedimiento

1. Agregar 100ul de Anti-IgM- Humana (Sigma) diluido 1:100 en buffer carbonato-bicarbonato pH: 9.6
2. Incubar a 4°C durante la noche
3. Bloquear con 100ul de PBS-SK (leche descremada) al 1.4%
4. Incubar por 15 min a temperatura ambiente
5. Decantar el contenido de la placa (sin lavar)
6. Diluir los sueros control (control positivo alto, medio y bajo, control negativo y sueros problema) 1:100 en PBS-SK al 1.4%. por ejemplo 5 ul de suero en 500ul de PBS-SK 1.4%.
7. Colocar 50ul de suero diluido a la placa por duplicado
8. Incubar por una hora a 37°C en cámara húmeda
9. Lavar 6 veces con PBS 1X- Tween20 al 0.05%. Por ejemplo 0.05 de Tween 20 en 100 ml de PBS 1X.
10. Colocar 50 ul de antígeno de dengue (DN1, DN2, DN3, DN4) diluido 1:40 en PBS 1X.
11. Incubar a 4°C durante la noche
12. Lavar 6 veces con PBS 1X- Tween20 al 0.05%
13. Agregar 25 ul de conjugado (anti dengue-HRPO) diluido 1:1500 en PBS-SK al 1.4%.
14. Incubar por una hora a 37°C en cámara húmeda
15. Lavar 6 veces con PBS 1X- Tween20 al 0.05%
16. Agregar 100 ul de sustrato ABTS*
17. Incubar 15 min a temperatura ambiente en oscuridad
18. Leer a 405-410nm

*el ABTS debe estar a temperatura ambiente cuando se utiliza, y este se prepara mezclando cantidades iguales de ABTS y H₂O₂

Importante: todas las muestras se hacen por duplicado. Se saca la media de las absorbancias. Absorbancias mayores o iguales a 1.33 son positivas, verificar con los controles.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Extracción de ARN QIAamp Viral RNA Kit. QIAGEN Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Notas Importantes:

1. Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C)
2. Equilibrar el Buffer AVE a temperatura ambiente para elusión en el paso 10.
3. Revise que el Buffer AW1, Buffer AW2 y el Carrier RNA hayan sido preparados de acuerdo a las instrucciones del protocolo.
4. Re-disolver el precipitado del Buffer AVL/Carrier RNA por calentamiento, si fuere necesario y estabilice a temperatura ambiente antes del uso.
5. Todos los pasos de centrifugación deben ser realizados a temperatura ambiente.
6. El RNA viral puede ser estable por un año si se almacena a -20°C ó -70°C.

Preparación de reactivos:

2. Adición del carrier RNA al buffer AVE: Agregar 310 ul de buffer AVE al vial que contiene 310 ug de carrier RNA liofilizado; alicuotar y guardar a -20°C. No descongelar más de 3 veces.
3. Preparación de Buffer de lavado AW1: 95 ml AW1 + 125 ml de etanol grado reactivo
4. Preparación de Buffer de lavado AW2: 66 ml AW2 + 160 ml de etanol grado reactivo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Extracción de ARN QIAamp Viral RNA Kit. QIAGEN Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Procedimiento:

1. Colocar 560 ul del Buffer AVL en un tubo de micro-centrifuga de 1.5ml.
2. Agregar 5.6 ul de la mezcla de carrier-AVE al cada vial
3. Agregar 140ul de Plasma al tubo que contiene el Buffer AVL/Carrier RNA. y Mezclar por vortex por 15 segundos.
4. Incubar a TA por 10 min
5. Dar una ligera centrifugada al tubo si este tuviese gotas en la tapa.
6. Agregar 560ul de Etanol (96-100%) a la muestra y mezclar bien por vortex durante 15 segundos. Después de mezclar de una ligera centrifugada al tubo para remover las gotas en el tapa.
7. Cuidadosamente trasvase 630 ul de la solución del paso 6 en la Columna QIAamp Spin (la columna se coloca sobre el tubo de colección de 2ml) asegúrese que la mezcla caiga en el centro de la columna (sin mojar el borde); cierre el tubo y centrifugue a 8,000 rpm por 1 min
8. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de colección de 2ml, descarte el tubo que contiene el filtrado y repita el paso 7. (Nota: esto es porque el volumen total es 1,260ul y se tiene que filtrar en dos pasos)
9. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 500ul de Buffer AW1 en el centro de la columna sin que se deslice por las paredes. Cierre el tubo y centrifugue a 8,000 rpm por 1 min
10. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de colección de 2ml, descarte el tubo que contiene el filtrado.
11. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 500ul de Buffer AW2 en el centro de la columna sin que se deslice por las paredes. Cierre el tubo y centrifugue a 14,000 rpm por 3 min
12. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de micro centrifuga de 1.5 ml y descarte el tubo de colección que contiene, el filtrado. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 60ul de Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. (paso de Elusión). Cierre el tubo e incube a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 min. y luego centrifugue a 8,600 rpm por 1 minuto
13. Descarte la Columna QIAamp Spin con el cuidado de ver el filtrado en el micro tubo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Extracción de ADN QIAamp DNA Kit – QIAGEN Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Notas Importantes:

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C)
- Calentar el baño María o el *Heating Blook* a 56°C para su posterior uso en el paso 4
- Todos los pasos de centrifugación deben ser realizados a temperatura ambiente

Procedimiento:

1. Colocar 200µl de la Muestra en un tubo de micro-centrifuga de 1.5ml
2. Agregar 20µl de QIAGEN PROTEASE al tubo que contiene la muestra
3. Agregar 200µl de Buffer AL a la muestra. Mezclar por vortex por 15 segundos
4. Incubar a 56°C por 10-15 min
5. Agregar 200µl de Etanol (96-100%) a la muestra y mezclar bien por vortex durante 15 segundos
6. Cuidadosamente aplique la mezcla del paso 5 en la Columna QIAamp Spin (la columna se coloca sobre el tubo de colección de 2ml) asegúrese que la mezcla caiga en el centro de la columna (sin mojar el borde), cierre el tubo y centrifugue a 8,600 rpm por 1 min
7. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de colección de 2ml, descarte el tubo que contiene el filtrado
8. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 500µl de Buffer AW1 en el centro de la columna sin que se deslice por las paredes. Cierre el tubo y centrifugue a 8,600 rpm por 1 min
9. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de colección de 2ml, descarte el tubo que contiene el filtrado
10. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 500µl de Buffer AW2 en el centro de la columna sin que se deslice por las paredes. Cierre el tubo y centrifugue a 14,000 rpm por 3 min
11. Coloque la Columna QIAamp Spin en un nuevo tubo de micro centrifuga de 1.5ml y descarte el tubo de colección que contiene el filtrado
12. Cuidadosamente abra la Columna QIAamp Spin y agregue 50µl de Agua Destilada. (Elusión)
13. Cierre el tubo e incube a temperatura ambiente (15-25°C) por 5-10 min
14. Centrifugue a 8,600 rpm por 1 minuto
15. Descarte la Columna QIAamp Spin con el cuidado de ver el filtrado en el tubo, y para mejor estabilidad del AND almacenar a -20°C

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Para la Cuantificación de Ácidos Nucleicos En el Nano Drop 2000 Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Toda persona que utilice el Nano-Drop 2000 deberá de seguir el siguiente procedimiento:

1. Colocarse su equipo de protección personal para el área negra
2. Abrir el programa que se encuentra en la en el escritorio de la computadora en el área negra para PCR
3. Escoger del menú la opción de cuantificación si es para ADN utilizar **nucleid acid**.
4. Confirmar que la tapadera del Nano-Drop 2000 este cerrada y esperar que haga la calibración respectiva
5. Guardar en un documento las lecturas a realizar (en la parte superior derecha)
6. Levantar la tapadera del Nano-Drop 2000, y colocar 3 ul de agua destilada grado molecular
7. Cerrar la tapadera con cuidado de no dejarla caer muy fuerte
8. Asegurarse que este en la opción de ADN en la parte superior derecha en color verde
9. Correr el blanco, la opción se encuentra en la parte superior izquierda, el icono **blank**, esperar unos segundos y luego apretar el icono **measure** sin sacar la muestra, esperando así su pronta lectura que aparecerá en la pantalla en la parte inferior
10. Levantar la tapadera y limpiar con papel lente cuidadosamente para no rayar la superficie del lector (se limpia arriba y debajo de cada una de las partes)
11. Para medir la concentración en las muestras se repiten los pasos del 7-9 colocando la muestra en vez del blanco
12. Limpiar entre cada 3 muestras con agua destilada para una mejor lectura

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para La Separación de Linfocitos Buffer de Lisis de Roche Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Tipo de Muestra:

Muestra sangre total con EDTA

Equipo y reactivos:

1. PBS(phosphate buffer salina)
2. Micro tubos 1.5 ml
3. Micro centrífuga
4. Buffer de lisis Roche

Importante:

El buffer de lisis debe de estar a temperatura ambiente antes de usarlo

Procedimiento

Para cada muestra de sangre a ser procesada:

1. Agregar 1 ml de byffer de lisis (Roche) en un micro tubo de 1.5ml
2. Agregar 500ul de sangre total de la muestra
3. Tapar el tubo y mezclar por inversión (no vortex)
4. Colocar el micro tubo en agitador a temperatura ambiente por 15 minutos
5. Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente a 2,500rpm
6. Remover cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta estéril
7. Agregar 1ml de buffer de lisis a los micros tubos
8. Mezclar por flicking, hasta que el pelet este re suspendido (no vortex)
9. Centrifugar 3 minutos a temperatura ambiente a 2,500rpm
10. Descartar el sobrenadante
11. Re suspender el pellet con PBS 1X

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para RT-PCR DENGUE Lanciotti/Rosario 1998. Modificado para Honduras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 4

Notas importantes

- La mezcla de reactivos del Nested RT-PCR deberá realizarse en el área blanca, con el equipo de protección personal completo (guantes y gabacha) exclusivo del área
- El área deberá estar limpia al momento de comenzar el trabajo en la misma

Procedimiento

1. Calcular los reactivos a utilizar en la reacción de acuerdo a la siguiente tabla

Vuelta 1 RT-PCR

Reactivos	Volumen (ul)	n+1=
Buffer 5X ez AMV RT Promega	20	
dNTPs 25mM	0.8	
DTT 100mM	1	
D1 100pmol/ul	1	
D2 100pmol/ul	1	
Taq Polimerasa (5U/ul) Promega sin MgCL2	1	
RT-AMV (10 U/ul) Promega	1	
Agua Libre de Nucleasas	58.2	
MgCL2	6	
Volumen Final	90 ul	
A los 90 ul de mezcla agregar 10 ul de ARN para un vol total de 100 ul		

Nota: Es importante que la reacción se mantenga siempre en **hielo**

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para RT-PCR DENGUE Lanciotti/Rosario 1998. Modificado para Honduras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 4

1. Hacer una solución madre en un vial nuevo y estéril con los reactivos anteriores
2. Colocar el volumen respectivo en cada vial y llevarlo a la cabina de trabajo en el área gris
3. Colocar la muestra a cada vial y llevarlo al área negra para colocarlo en el termociclador
4. Buscar el programa en el termociclador y comenzar la corrida

Condiciones de amplificación de la primera vuelta

Ciclos	Programa de ciclos	
	Temperatura	Tiempo
1	42 °C	40 min
1	95 °C	5 min
30	94 °C	30 seg
	55°C	1 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	10 min
∞	4 °C	∞

5. Al finalizar la corrida prepara los reactivos de la segunda vuelta en el área blanca nuevamente de la siguiente manera

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para RT-PCR DENGUE Lanciotti/Rosario 1998. Modificado para Honduras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 3 de 4

Vuelta 2 RT-PCR

Reactivos	Volumen (ul)	n+1 =
Buffer 5X ez Taq Promega	20	
dNTPs 25mM	0.8	
DTT 100mM	1	
D1 100pmol/ul	1	
TS1 100pmol/ul	1	
TS2 100pmol/ul	1	
TS3 100pmol/ul	1	
TS4 100pmol/ul	1	
MgCl ₂ a 25mM* (Cuba)	6	
Taq Polimerasa (5U/ul) Promega sin MgCL ₂	1	
Agua Libre de Nucleasas	65.2	
Volumen Final	99 ul	
A los 99 ul de la mezcla se agregara 1ul del producto obtenido de la primera vuelta para un vol total de 100 ul		

6. Hacer una solución madre en un vial nuevo y estéril con los reactivos anteriores
7. Colocar el volumen respectivo en cada vial y llevarlo al área negra
8. Colocar a cada vial 1 ul del producto amplificado en la primera vuelta y colocarlo en el termociclador
9. Buscar el programa en el termociclador y comenzar la corrida

Al finalizar la corrida, apagar el equipo y extraer las muestras del termociclador, guardarlas a -20°C o utilizarlas en la electroforesis

Nota: es importante recordar que cada vez que cambia de área (blanca, negra o gris) debe utilizar el equipo de protección personal destinado para ese fin

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para RT-PCR DENGUE Lanciotti/Rosario 1998. Modificado para Honduras Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 4 de 4

Condiciones de amplificación de la segunda vuelta

Ciclos	Programa de ciclos	
	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	5 min
30	94 °C	30 seg
	55 °C	1 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	7 min
∞	4 °C	∞

10. Al finalizar la corrida, apagar el equipo y extraer las muestras del termociclador, guardarlas a -20°C o utilizarlas en la electroforesis (100-120 voltios, por 30-40 minutos) con un gel al 2% de agarosa y teñido con bromuro de etidio y un marcador de peso molecular de 100pb

Nota: es importante recordar que cada vez que cambia de área (blanca, negra o gris) debe utilizar el equipo de protección personal destinado para ese fin

Visualización de los resultados

Serotipos de Dengue	Pesos moleculares
Dengue 1	482 pb
Dengue 2	119 pb
Dengue 3	290 pb
Dengue 4	392 pb

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Electroforesis en geles de agarosa Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Preparación de las muestras para la electroforesis

1. En un papel para film, colocar el buffer de corrida para cada muestra a dispensar en el gel(si son 10ul por pocillo colocar 2.5, si son 20 ul colocar 4-5ul)
2. Tomar de la muestra descongelada la cantidad necesaria para completar el volumen a 10 ó 20 ul
3. Mezclar la muestra con el buffer de corrida antes de colocarla en la gel

Preparación de la cámara de electroforesis

1. Colocar la gel en la cámara de electroforesis previamente nivelada
2. Llenar la cámara con el buffer de corrida (generalmente TAE/TBE 1X) hasta que cubra el gel, sin que se derrame de la cámara
3. Colocar las muestras en los pocitos con cuidado para evitar derrames o paso de un pocito a otro y el marcador de peso molecular respectivo
4. Colocar la tapa de la cámara y conectarla a la fuente de poder para la electroforesis

Nota: las muestras correrán del polo negro hacia el rojo, y asegurarse de conectar el cable negro y rojo en la posición respectiva

Para realizar la corrida electroforética

1. Conectar el equipo a la celda de poder
2. Encender el equipo, el botón que esta localizado a un lado de la unidad
3. En la pantalla frontal presionar **const** para seleccionar el voltaje constante
4. Use las flechas hacia arriba y abajo para la selección del **const**, por default en voltaje constante es 400mA
5. Para seleccionar los parámetros de la electroforesis, oprima las flechas para arriba o abajo para colocar el voltaje, el amperaje y el tiempo de la corrida electroforética
6. Presione **Run** para dar inicio a la electroforesis
7. Al finalizar la corrida apagar el equipo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Electroforesis en geles de agarosa Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Para la visualización de la electroforesis

1. Sacar el gel de la cámara de electroforesis con cuidado de que no se rompa o deslice y colocarlo en la bandeja del **Gel Doc**
2. Buscar el programa de visualización de geles Quantity One en el escritorio de la computadora conectada al Gel Doc
3. Irse a File y buscar Gel Doc XR, aparecerá la pantalla de visualización de geles
4. Luego apretar el botón de Trans UV en el Gel Doc y la imagen comenzara a aparecer en la pantalla, ajustarla con los comandos respectivos
5. Para poder escribir encima de la foto apretar la tecla Annotate y aparecerá una herramienta de escritura Text Oveelay Tools
6. Para guardar la imagen irse a File y tomar la opción Export to JPEG image. Se abrirá una ventana Export mode y colocarla hasta el 100% , apretar Export, luego escoger el sitio donde guardara la imagen.
7. Extraer la gel de la bandeja
8. Descartarla en el recipiente plástico para este fin
9. Apagar el equipo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El polimorfismo en DC-SIGN1-336 A/G por PCR-RFLP Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

El Polimorfismo del DC-SIGN -336 A/G, esta codificado en la región del promotor del gen CD 209 localizado en el cromosoma 19 de células humanas. La metodología está basada en PCR y FRLP.

- Extracción del ADN de células mono-nucleares de sangre periférica.
- Reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes primers:
 - 5'-GGATGGTCTGGGGTTGACAG-3'
 - 5'-ACTGGGGGTGCTACCTGGC-3'

Después de la amplificación se obtendrá una banda de 150 pares de bases donde se encuentra el sitio de restricción de la Enzima MscI.

 - Se hará una corrida electroforética en gel para observar el producto amplificado.
- Digestión con enzimas de restricción:
 - El producto amplificado de 150 pares de bases será sometido a la digestión con la enzima de restricción MscI (TGGCCA) donde su punto de corte es $TGG^{\wedge}CCA / ACC^{\wedge}GGT$
- Electroforesis en gel de agarosa para observar los diferentes alelos
- Interpretación:

Alelos	Corte en los sitios de restricción
A	1 banda 150 pb.
G	2 bandas de 131 y 19 pb

Alelos	Resultados esperados
G/G Homocigoto	2 bandas de 131 y 19 pb
G/A Heterocigoto	3 bandas de 150, 131 y 19 pb
A/A Homocigoto	1 banda de 150 pb

Nota: Ver en los anexos los protocolos de trabajo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El polimorfismo en FcRyIIa-131 por PCR-RFLP Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

El Polimorfismo del receptor Fc γ IIa, está localizado en CD 32. La metodología está basada en PCR y FRLP.

1. Extracción del ADN de células mono-nucleares de sangre periférica.
2. Reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes primers:
 - Sense: 5'-GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC-3'
 - Antisense: 5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3'
 Después de la amplificación se obtendrá una banda de 366 pares de bases donde se encuentra el sitio de restricción de la Enzima BstUI.
 - Se hará una corrida electroforética en gel para observar el producto amplificado.
3. Digestión con enzimas de restricción:
 - El producto amplificado de 366 pares de bases será sometido a la enzima de restricción BstUI (5'-CGCG-3') donde su punto de corte es CG[^]CG
4. Electroforesis en gel de agarosa para observar los diferentes alelos
5. Interpretación:

Alelo	Banda esperada
H	343 pb
R	322 pb

Alelos	Resultados esperados
R/R Homocigoto	1 banda de 322 pb
R/H Heterocigoto	2 bandas de 322 y 343 pb
H/H Homocigoto	1 banda de 343 pb

Nota: Ver en los anexos los protocolos de trabajo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El polimorfismo en VDR-352 por PCR-RFLP Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

El locus del receptor de vitamina D, está localizado el cromosoma 12q13.1 [Uitterlinden et al., 2004] con un tamaño de más de 100Kb. La metodología está basada en PCR y FRLP.

- Extracción del ADN de células mono-nucleares de sangre periférica.
- Reacción en cadena de la polimerasa con los siguientes primers:
 - A: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'
 - B: 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA-3'
 - Después de la amplificación se obtendrá una banda de 745 pares de bases donde se encuentra el sitio de restricción de la Enzima TaqI.
 - Se hará una corrida electroforética en gel para observar el producto amplificado.
- Digestión con enzimas de restricción:
 - El producto amplificado de 745 pares de bases será sometido a la enzima de restricción TaqI (T[^]CGA) donde su punto de corte es T[^]CG[^]A / A[^]GC[^]T
- Electroforesis en gel de agarosa para observar los diferentes alelos
- Interpretación:

Alelos	Corte en los sitios de restricción
T	494 y 251 pb
C	293, 251, y 201 pb

Alelos	Resultados esperados
T/T	2 bandas 251 y 494 pb
T/C	4 bandas 494, 293, 251, y 201 bp
C/C	293, 251, y 201 pb

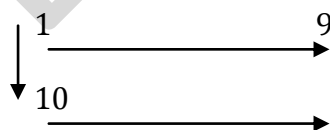
Nota: Ver en los anexos los protocolos de trabajo

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar para Almacenamiento y embalaje de muestras para envío en hielo seco	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2
Laboratorio Virología		

Las muestras que serán enviadas deberán prepararse de la siguiente manera:

1. Antes de colocar la muestra en los viales, rotular correctamente con el código de la muestra respectiva. La rotulación puede hacerse con marcador indeleble en la zona corrugada del vial, también puede colocarse una etiqueta criogénica con el código de la muestra, y en caso de no tener de estas etiquetas, colocar etiquetas plastificadas colocando tape transparente alrededor para evitar que se despegue por el frío y la humedad.
2. Colocar las muestras de suero/plasma o linfocitos en viales criogénicos con tapón de rosca(nunca viales de micro centrífuga como por ejemplo Eppendorf)
3. Tener cuidado de llenar los viales criogénicos hasta máximo la línea de llenado. Tener cuidado de no sobrellenar los viales criogénicos pues estos se pueden abrir por la temperatura y la presión en el envío
4. Para asegurar la integridad de la muestra colocar papel parafilm alrededor de la tapa de los viales criogénicos
5. Colocar los viales en las cajas criogénicas comenzando de arriba hacia abajo de izquierda a derecha, como en el diagrama



6. Colocar las cajas criogénicas rotuladas correctamente, en el freezer de -80°C varias horas antes de realizar el envío con el fin que la muestra se encuentre congelada en la posición correcta (verticales) antes del envío, para que la muestra no se congele en la tapa del vial.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar para Almacenamiento y embalaje de muestras para envío en hielo seco Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Para el embalaje de las cajas debe seguirse el siguiente procedimiento:

1. las cajas criogénicas con tape o masking tape
2. Envolverlas las cajas criogénicas en papel toalla, incluso con hules para asegurarse de que no se abran por el movimiento en el envío
3. Colocar las cajas criogénicas en bolsas ziploc (bolsas con cerradura)
4. Colocar las cajas criogénicas en forma ordenada en la caja con hielera (caja externa para el envío) asegurándose de dejar suficiente espacio para colocar el hielo seco alrededor de las mismas.
5. Asegurar las cajas criogénicas con tape o masking tape
6. Envolverlas las cajas criogénicas en papel toalla, incluso con hules para asegurarse de que no se abran por el movimiento en el envío
7. Colocar las cajas criogénicas en bolsas ziploc (bolsas con cerradura)
8. Colocar las cajas criogénicas en forma ordenada en la caja con hielera (caja externa para el envío) asegurándose de dejar suficiente espacio para colocar el hielo seco alrededor de las mismas.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso del Termociclador Sistema (PCR) 9700 GeneAmp® Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Toda persona que utilice el Termociclador deberá de seguir el siguiente procedimiento:

Preparación e inicio de una reacción

Instrucciones generales

1. Prepare las muestras en los tubos desechables MicroAmp® PCR
2. Coloque los tubos desechables en los pocillos del instrumento y cierre la tapa
3. Seleccione un método. Inicie la reacción

Comandos y funciones

1. Use las teclas de función variable (teclas F), las flechas y el teclado numérico ubicado debajo de la pantalla para ejecutar los comandos y funciones, para desplazarse y para introducir los datos
2. Para ejecutar las funciones que se muestran a lo largo de la parte inferior de la pantalla, presione la tecla F correspondiente ubicada debajo de la pantalla
Nota La pantalla del Sistema GeneAmp 9700 no es del tipo táctil

Selección de métodos

1. En el menú principal, presione **Run** (Ejecutar). Aparecerá la pantalla de métodos almacenados (Stored Methods). Elija un método. El GeneAmp 9700 contiene seis métodos pre-programados (AmpliCycle Sequencing, AmpliTaq® DNA Polymerase, BigDye™ Terminators, LMS2, Touchdown PCR, XL PCR)
2. Si lo desea puede modificar estos métodos o crear métodos nuevos y almacenarlos junto con los métodos incorporados

Presentación en pantalla de los parámetros de métodos

En la pantalla Stored Methods, presione **View** (Ver). Después de revisar los parámetros pre-PCR, PCR y post-PCR de un método almacenado, presione **Start** (Iniciar) para ejecutar el método o presione **Return** (Volver) para volver a la pantalla Stored Methods

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso del Termociclador Sistema (PCR) 9700 GeneAmp® Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Ejecución de los métodos

1. En el menú principal (Main), presione **Run**. Elija un método. Presione **Start** (Iniciar). En la pantalla Stored Methods, presione **Start** para iniciar la reacción
2. En cualquier momento de una reacción, puede hacer una pausa de hasta 10 minutos presionando **Pause**. Presione **Resume** (Reanudar) para continuar el método antes de transcurridos los 10 minutos
3. Para detener una reacción en cualquier momento, presione la tecla **Stop** (Detener) en el teclado. La reacción se detiene por un tiempo y luego se cancela el proceso. La reacción puede reanudarse durante este período de pausa presionando **Resume**

Modificación de los métodos

- En el menú Main, presione **Edit** (Modificar) para cambiar los parámetros de un método determinado

Inserción de segmentos y ciclos

- Seleccione un segmento de tiempo o temperatura. Presione **More** (Más) para acceder a la función de inserción. Presione **Insert** (Insertar). Presione **Hold** (Espera) para insertar un nuevo segmento o presione **Cycle** para insertar un ciclo

Designación y almacenamiento de métodos

Desde la pantalla Create estando en la etapa PCR del método, presione **Store** (Almacenar). Para aceptar el nombre predeterminado, presione **Accept** (Aceptar). Presione **Method** (Método) para indicar el nombre deseado para el método. Presione **Accept** para almacenar el método con el nombre especificado

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso de Lavador de Placas TECO Diagnostic Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Antes de realizar el lavado de las placas de interés:

Antes de iniciar los lavados agregar etanol al 50% al recipiente Wash Bottle y realizar la limpieza con esta solución de los dispensadores de buffer en este orden:

- a- Presione la tecla “Prime” y deje que realice el lavado
- b- Presione la tecla “Rinse” y deje que realice el lavado
- c- Realizar de la misma forma dos lavados con agua destilada
- d- Una vez que termina este procedimiento puede agregar el buffer de interés al “wash bottle” e iniciar los lavados de su placa

Procedimiento de lavado:

- 1- Presione la tecla “Disp” y en la pantalla será indicado el volumen que se dispensará a cada pocito
- 2- Presione la tecla “yes” 3 veces para iniciar el lavado con el buffer específico para cada prueba
- 3- Una vez que termina de lavar presione la tecla “asp” para que aspire cada uno de los pocitos

Agregue nuevamente etanol al 50% al recipiente Wash Bottle y realice la limpieza de los dispensadores de buffer con esta solución y luego con agua destilada como se indicó anteriormente

Nota:

Wash Bottle: recipiente para agregar la solución de lavado o etanol

Waste Bottle: recipiente para agregar la solución de cloro

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso del lector de ELISA Teco Diagnostics TC-9 Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Para el procedimiento normal de ELISAs (kit comerciales) se seguirá el siguiente procedimiento

Importante: Siempre ver el inserto del ensayo con las especificaciones

1. Encender la impresora
2. Colocar papel en la bandeja y esperar que lo acomode
3. Encender el lector de ELISA
4. Colocar la placa como lo indica el equipo (la letra A de la placa concuerda con la letra A en el aparato)
5. Apretar **No. 1** (para ver el modo absorvancia)
6. Apretar el **No. 2** para seleccionar el filtro a utilizar (450nm)
7. Apretar **enter**
8. Apretar **No. 4** para seleccionar el filtro de referencia (630nm)
9. Apretar **enter**
10. Apretar **H** para que la lectura se haga horizontalmente en la pagina de impresión
11. En la tecla de blanco apretar **NO** (para que no lea blanco)
12. Apretar **read** para comenzar la lecturas

Al finalizar de leer

1. Sacar la placa
2. Apretar **stop**
3. Apretar 2 veces **clear**
4. Apagar el lector
5. Sacar la hoja impresa
6. Apagar la impresora

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procesoamiento Técnico Documental y Digital Procedimiento Operativo Estándar Para El uso del lector de ELISA Teco Diagnostics TC-9 Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Para el procedimiento normal de MAC-ELISA se seguirá el siguiente procedimiento

1. Encender la impresora
2. Colocar papel en la bandeja y esperar que lo acomode
3. Encender el lector de ELISA
4. Colocar la placa como lo indica el equipo (la letra A de la placa concuerda con la letra A en el aparato)
5. Apretar **No. 1** (para ver el modo absorvancia)
6. Apretar el **No. 1** para seleccionar el filtro a utilizar (405nm)
7. Apretar **enter**
8. Apretar No. 4 para seleccionar el filtro de referencia (630nm)
9. Apretar **enter**
10. Apretar **H** para que la lectura se haga horizontalmente en la pagina de impresión
11. Apretar la tecla **blank** (leer blanco) aparecerá en la pantalla blank must be well #1
12. Apretar **read** o **yes** para comenzar la lecturas

Al finalizar de leer

1. Sacar la placa
2. Apretar **stop**
3. Apretar 2 veces **clear**
4. Apagar el lector
5. Sacar la hoja impresora
6. Apagar la impresora

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso del Esterilizador de Vapor de Alta Presión (Yamato Scientific America Inc. Santa Clara, CA) Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Antes de iniciar el esterilizado:

1. Asegurarse que la válvula de drenaje este cerrada
2. Que este colocada la placa inferior al interior de la cámara del autoclave
3. Que el nivel del agua dentro de la cámara sea la recomendada por la placa interior
4. Que el recipiente lateral este colocado y con 1.5 litros de agua siempre
5. Que las canastas estén correctamente colocadas (siempre colocar el material a esterilizar dentro de las canastas)
6. Que el autoclave este bien cerrado

Procedimiento de esterilizado:

1. Encender el equipo (interruptor localizado en el lado izquierdo de la unidad)
2. presione la tecla **menú** y seleccionar **sterilize**. Si desea esterilizado y secado escoja la opción **esterilize & dry**
3. Fijar la temperatura de esterilización y el tiempo deseado (generalmente 121°C, 15lb de presión por 15 minutos para material limpio y para sucio 20 minutos)
4. Presione la tecla **enter** para iniciar el proceso de esterilizado (la pantalla mostrara la temperatura y el tiempo del proceso) hasta que alcanza la temperatura deseada comienza el conteo del tiempo
5. Al terminar de esterilizar aparecerá en la pantalla **end**, presione la tecla **enter** y puede abrir la cámara del autoclave y sacar su material ya estéril
6. Al presionar la tecla **enter** se reprograma el procesador. El equipo esta listo para comenzar otro ciclo de esterilización

Cuidados:

1. Verificar siempre los niveles de agua dentro de la cámara y utilizar agua destilada
2. Verificar que el recipiente lateral este bien colocado y con el volumen recomendado de agua
3. Limpiar frecuentemente la cámara (reemplazando el agua de la cámara) y no utilizar ningún químico para su limpieza
4. No manipular el recipiente lateral mientras el equipo este en funcionamiento
5. No abrir la tapa de la cámara antes que la presión haya bajado a cero

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El uso de la Cabina de Trabajo (LABCONCO) Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Toda persona que utilice la cabina de trabajo deberá de seguir el siguiente procedimiento:

Antes de iniciar el trabajo:

1. Asegurarse de tener el equipo de protección personal (guantes y gabacha)
2. Extraer todo el material que se encuentre dentro de la cámara, para poder limpiarla
3. Limpiar la mesa y las paredes de la cabina con una gaza impregnada con cloro al 10%, y luego con alcohol etílico al 70%.
4. Luego introducir el material a necesitar, asegurándose se encuentre limpio al momento de colocarlo en la cabina
5. Encender la lámpara de luz U.V. y dejar por 15-30 minutos

Para iniciar el trabajo:

1. Apagar la luz U.V. y encender la luz normal
2. Asegurarse de tener todo el material a necesitar cerca o dentro de la cabina de trabajo
3. Colocar todo el material limpio a un lado de la cabina y el sucio al otro lado
4. Colocar 2 recipientes, uno con cloro al 10% para material reutilizable y otro con bolsa de seguridad biológica para descarte y esterilización
5. Trabajar ordenadamente y al terminar despejar la cabina de trabajo y dejar limpio

Cuidados:

En caso de derrame en la cabina. Limpiar con una gaza impregnada con cloro al 10% y secar con papel absorbente

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Uso de la Balanza METTLER J Series balances Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Para utilizar la balanza seguir las instrucciones

1. Colocar la balanza en una superficie plana y alejada de las corrientes de aire
2. Conectar la balanza a la fuente de energía eléctrica
3. Apretar la parte frontal debajo de la pantalla para encenderla
4. Apretarla nuevamente para la calibración de la balanza
5. Cuando s haya estabilizado el lector esta lista para pesar
6. Colocar el recipiente para pesar encima del plato de la balanza
7. Apretar nuevamente la tecla frontal para tarar
8. Pesar la cantidad correspondiente
9. Al terminar de pesar retirar la sustancia o material del plato
10. Limpiar si fuere necesario con una escobilla o gaza
11. Para apagar la balanza levantar la tecla frontal hacia arriba
12. Desconectar la balanza y tapparla con el cobertor

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El lavado de material reusable Laboratorio de Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Para el material que se utiliza en el área gris o serología se seguirá el siguiente procedimiento

1. Portar el equipo de protección personal (gabacha de lavado y guantes)
2. Colocar puntas, tubos o pipetas de vidrio o plástico en recipientes impermeables con cloro al 10%
3. Dejar en cloro al 10% por 24 horas
4. Descartar el cloro y proceder a lavar el material con detergente de ser necesario para eliminar los restos
5. Colocar el material en un recipiente conteniendo ácido clorhídrico (HCl) al 1% toda la noche
6. Extraer el material del ácido con un colador (el HCl es reutilizable)
7. Lavar con agua dura abundantemente
8. Colocar el material en un recipiente con agua dulce para enjuagar y finalmente con agua destilada
9. Escurrir el material y dejar secar a temperatura ambiente o en horno

Para el material del área de PCR (área negra)

1. Colocar el material sumergido en un recipiente con cloro al 10% por 24 horas
2. Sacar el material y lavar con agua dura
3. Luego enjuagar con agua dulce y luego con agua destilada
4. Dejar secar a temperatura ambiente o en horno

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para El descarte de material infeccioso Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 1

Todo material a ser descartado deberá seguir el siguiente procedimiento

1. Colocar el material infecciosos en un recipiente impermeable (bolsas de seguridad biológicas) pueden ser puntas, pipetas tubos, guantes...etc. Que se encuentran en la cabina de trabajo
2. Las agujas deberán ser colocadas en recipientes impermeables e imperforables antes de su esterilización
3. Colocar el material en el recipiente de descarte de material infeccioso
4. Colocar en el esterilizador(Autoclave) por 20 minutos a 121 grados Celsius y 15 libras de presión
5. Después de terminada la esterilización del material descartar el material en la basura común

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Tratamiento de los derrames en el laboratorio Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 1 de 2

Material:

- ✓ Bolsas plásticas para desechos de sustancias bio-infecciosas.
- ✓ Paños o papel absorbente
- ✓ Solución de hipoclorito de sodio al 1% como agente desinfectante
- ✓ Soluciones de HCl 0.1N y NaHCO₃ al 3% como agentes neutralizantes comunes (en caso de derrame de bases o ácidos respectivamente)
- ✓ Recogedores y pinzas

En caso de derrame de material bio-infeccioso:

1. Cubrir el derrame con un paño o papel absorbente.
2. Verter hipoclorito de sodio 1% sobre este material absorbente y dejar actuar durante 20-30 minutos aproximadamente
3. Retirar el paño o papel absorbente y descartar en el recipiente de material bio-infeccioso.
4. En caso de existir fragmentos de vidrio estos se manipularán con recogedor y/o pinza y se depositarán en el contenedor de punzocortantes.
5. El material infeccioso obtenido del derrame se tratará en autoclave o se sumergirá en solución de hipoclorito de sodio 1% para su desinfección.

En caso de derrame de sustancias químicas:

1. Colocar sobre el derrame el material absorbente adecuado considerando la naturaleza de la sustancia química implicada.
2. Neutralizar la sustancia química de acuerdo a lo especificado en la MSDS.
3. Lavar la superficie afectada con agua y jabón.

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011

Universidad Nacional Autónoma de Honduras	Procedimiento Operativo Estándar Para Tratamiento de los derrames en el laboratorio Laboratorio Virología	Archivo: POEFGD Fecha : Marzo 2011 Revisión : Primera
Escuela de Microbiología		Página 2 de 2

Condiciones generales:

Los derrames de sustancias químicas, no sólo afectan a las operaciones de laboratorio, sino que pueden suponer un riesgo para las personas, los equipos y las instalaciones. En la mayor parte de los casos, los derrames se deben a pequeñas cantidades de productos y pueden ser controlados y eliminados por el mismo personal del laboratorio de acuerdo con la hoja de seguridad de la sustancia química involucrada.

Condiciones específicas:

Se deberán tener al alcance las MSDS de los agentes infecciosos con los que se trabaja y las MSDS de las sustancias químicas que se utilizan en el laboratorio a fin de conocer la forma adecuada de actuar ante un derrame.

Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- ✓ Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes, mascarilla, gafas, etc.) a fin de evitar exposición a los agentes o sustancias involucrados en el derrame.
- ✓ Se deberá contar con un kit diseñado especialmente para el manejo de un derrame, el cual deberá contener: paños o papel absorbente, pinzas, recogedores, solución de hipoclorito de sodio 1%, soluciones neutralizantes comunes (ácido clorhídrico y bicarbonato de sodio).

Redactado por: Cynthia Rodríguez	Revisado por: Wendy Murillo	Aprobado por: Dra. Ivette Lorenzana
Fecha: Febrero 2011	Fecha: Marzo 2011	Fecha: Marzo 2011