



Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC

para la detección del virus del dengue
e identificación de su serotipo

Instrucciones de uso Prospecto

N.º de catálogo KK0129
200 reacciones

Para distribución internacional
(Países fuera de los EE. UU.)



Para uso en diagnóstico in vitro
Se han determinado las características de desempeño

05-01-2013

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas
División de Enfermedades Transmitidas por Vectores
Subdivisión de Dengue
1324 Calle Cañada, San Juan, PR 00920



ÍNDICE

1. USO PREVISTO	4
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN.....	5
2.1 Principios del procedimiento.....	6
3. RESUMEN DEL PROCESO DE LA PRUEBA PARA EL DENGUE	7
4. MATERIALES SUMINISTRADOS.....	8
5. MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)	11
5.1 Reactivos.....	11
5.2 Equipos y consumibles necesarios (pero no suministrados).....	11
6. INFORMACIÓN IMPORTANTE DE VIGILANCIA DE LA SALUD PÚBLICA	12
7. ALMACENAMIENTO, MANEJO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS.....	13
8. RECOLECCIÓN, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	13
8.1 Recolección de muestras.....	13
8.2 Transporte de muestras	13
8.3 Almacenamiento de muestras.....	14
9. REMISIONES DE MUESTRAS A LOS CDC	14
10. PREPARACIÓN DE CONTROLES Y REACTIVOS	14
10.1 Preparación de la sonda y el oligonucleótido iniciador.....	14
10.2 Preparación del control de muestra humana (HSC).....	15
10.3 Preparación de la mezcla de control positivo para DENV-1-4.....	15
10.4 Preparación general.....	16
11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	16
12. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO (ARN)	17
13. PREPARACIÓN DEL ENSAYO	17
13.1 Preparación de la mezcla maestra/preparación de la placa	17
14. CREAR UNA PLANTILLA DE EJECUCIÓN EN EL INSTRUMENTO PARA RT-PCR EN TIEMPO REAL 7500 FAST DX DE ABI	20
14.1 Ensayo en modo singleplex	22
14.2 Ensayo en modo multiplex	28
15. DEFINICIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DEL INSTRUMENTO	32
16. REALIZAR UN ANÁLISIS	33
17. ANÁLISIS DE DATOS.....	37
18. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	39
18.1 Resultados de control y extracción e interpretación	39
19. GUÍA DEL USUARIO PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DENV-1-4 DE LOS CDC	41
20. CONTROL DE CALIDAD	41
21. LIMITACIONES.....	42
22. VALORES ESPERADOS	42
23. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO	43
23.1 Desempeño clínico	43
23.2 Reproducibilidad.....	45
23.3 Sensibilidad analítica	47



23.4 Especificidad analítica.....	52
23.5 Transferencia/contaminación cruzada.....	53
24. REFERENCIAS	54
25. RECURSOS ADICIONALES	55
26. INFORMACIÓN DE CONTACTO, PEDIDOS Y SOPORTE DE PRODUCTO.....	56





Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC

para la detección del virus del dengue e identificación de su serotipo

I. USO PREVISTO

El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) está diseñado para utilizarse en el instrumento para RT-PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems (ABI):

- Para el diagnóstico de dengue en suero o plasma obtenido de pacientes con signos y síntomas compatibles con el dengue (leve o severo) durante la fase aguda.
- Para la identificación de los serotipos 1, 2, 3 o 4 del virus del dengue a partir del ARN viral en suero o plasma (citrato de sodio) obtenido de pacientes humanos con dengue durante la fase aguda.
- Para proporcionar información epidemiológica para la vigilancia de los virus del dengue circulantes.

El análisis de muestras clínicas de sangre (suero o plasma) con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC no debe realizarse a menos que el paciente cumpla con los criterios clínicos y/o epidemiológicos para analizar casos sospechosos de dengue.

El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC no está autorizado ni aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) para la evaluación de donantes de sangre o plasma.

Los resultados negativos obtenidos con esta prueba no excluyen el diagnóstico de dengue y no deben usarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo de pacientes.

Este dispositivo fue diseñado para distribución a laboratorios. El personal debe estar capacitado, con experiencia en procedimientos de análisis de diagnóstico molecular estandarizados y en diagnóstico viral. Deben contar con contención y equipos de bioseguridad adecuados.



2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El dengue es una enfermedad causada por infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV) relacionados (DENV-1, 2, 3 y 4), los cuales son transmitidos por los mosquitos *Aedes* sp y afectan a unos 50 millones de personas en aproximadamente 100 países cada año (1). La infección por un serotipo del DENV proporciona inmunidad a largo plazo para ese serotipo pero no para los otros tres. Por lo tanto, en los países donde el dengue es endémico, es probable que los habitantes se infecten más de una vez durante su vida. Dentro del territorio de los Estados Unidos, el dengue es endémico en Puerto Rico (2-4), las Islas Vírgenes (5, 6), Samoa Americana y otras islas del Pacífico. En áreas no endémicas dentro de los Estados Unidos, el dengue es la causa más frecuente de enfermedad febril entre los viajeros que regresan de zonas tropicales o subtropicales del Caribe, América Latina y Asia (7). Además, ocasionalmente ocurren brotes en áreas de los Estados Unidos donde hay presencia del mosquito vector, como a lo largo de la frontera entre EE. UU. y México (8, 9), Florida (10, 11) y Hawaii (12). En los Estados Unidos, el dengue es una enfermedad cuya declaración es obligatoria a nivel nacional.

La mayoría (~75%) de las infecciones por DENV son asintomáticas. Entre las personas con infección por DENV (dengue) sintomática, la enfermedad se desarrolla en tres fases (1). Durante la fase aguda, el síntoma principal es fiebre de 2 a 7 días y suele ir acompañada por uno o más de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, dolor ocular retroorbital, dolor articular, dolor muscular y/u óseo, sarpullido, manifestaciones de sangrado leves (por ejemplo, sangrado de la nariz o las encías, petequias o hematomas que se producen con facilidad) y bajo recuento de glóbulos blancos. La fase crítica del dengue comienza en la defervescencia que marca un período de 24 a 48 horas en el que puede ocurrir un shock compensado o descompensado debido a un aumento de la permeabilidad capilar con pérdida de plasma que produce ascitis, derrames pleurales y “tercer espacio” de fluidos. La presencia de estos signos y/o síntomas actualmente se denomina dengue severo en vez de la fiebre hemorrágica del dengue o síndrome de shock por dengue. Sin el tratamiento adecuado, los pacientes con dengue severo están en riesgo de muerte. Otras señales de alerta de dengue severo incluyen dolor abdominal, vómitos, trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas de leves a graves, incluida la tendencia a presentar hematomas con facilidad, petequias, menorragia y hemorragia de la membrana mucosa de la nariz o de las encías. La fase de convalecencia del dengue tiene una duración de 4 a 7 días (1).

El diagnóstico de dengue en el laboratorio se realiza mejor durante la fase aguda de la enfermedad cuando el DENV circula en la sangre y se puede descubrir mediante ensayos para la detección del ARN viral (13-15) o los antígenos solubles (p. ej., antígeno NS1) (16). El anticuerpo IgM contra el DENV también se produce durante la fase aguda de la enfermedad y alcanza un nivel detectable mediante el método ELISA entre el 3.º y 5.º día después de la aparición de fiebre (17, 18). Hasta el momento, no se ha determinado el algoritmo de análisis óptimo para el dengue. Si los resultados de la prueba de detección de DENV (p. ej., RT-PCR en tiempo real) son negativos (días 1 a 5 después del inicio de la fiebre), se debe considerar analizar la IgM contra el DENV. Si el paciente se presenta por primera vez durante la fase crítica o de convalecencia de la



enfermedad, el diagnóstico en el laboratorio se realiza mejor con una prueba para el anticuerpo IgM contra el DENV.

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

2.1 Principios del procedimiento

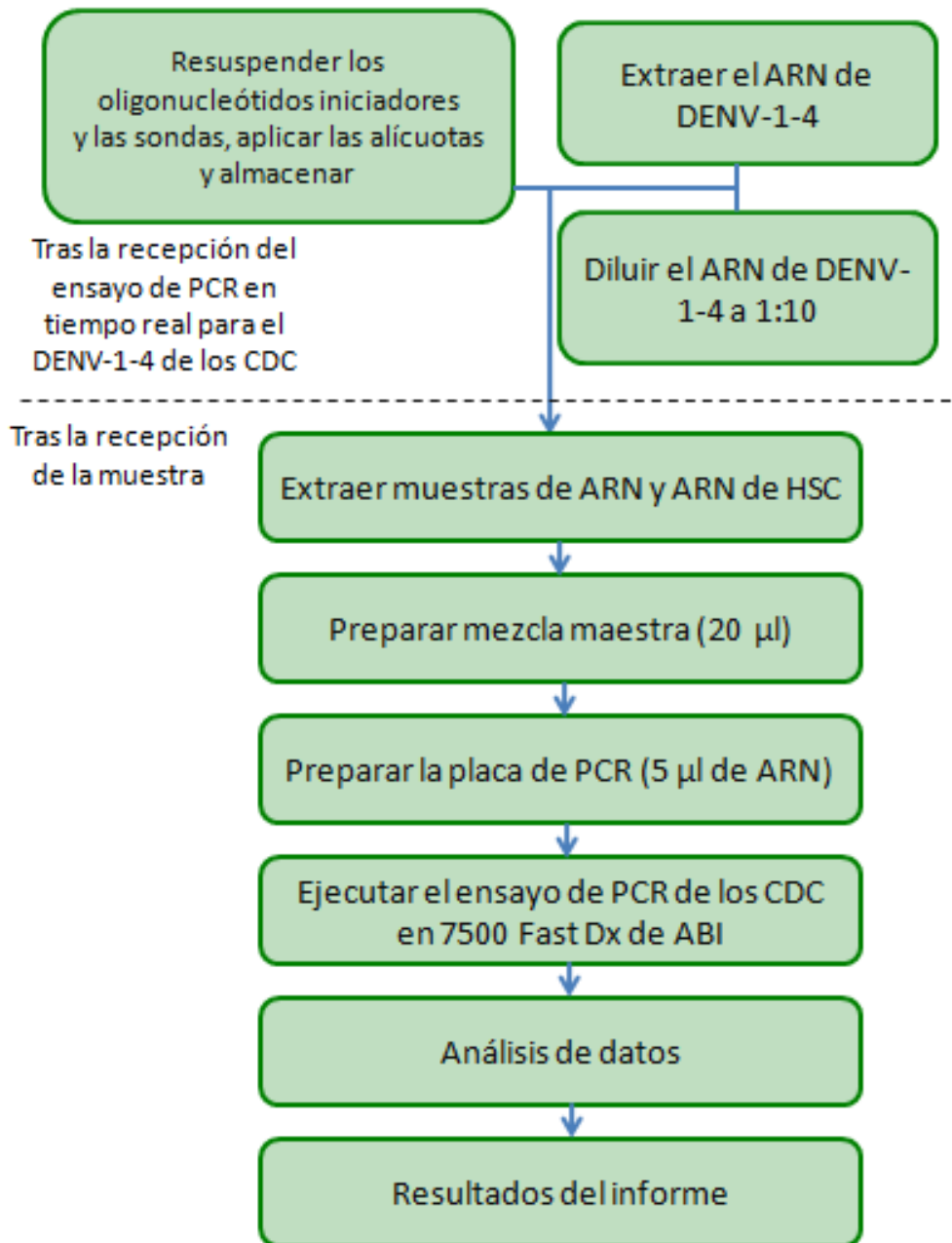
El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se utiliza con el instrumento para PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de ABI. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC incluye un conjunto de oligonucleótidos iniciadores y sondas de hidrólisis con doble marcador (Taqman®) para la detección cualitativa in vitro de los serotipos 1, 2, 3 o 4 de DENV a partir de suero o plasma obtenidos de pacientes humanos con signos y síntomas que corresponden al dengue (leve o grave). Las regiones objetivo del ARN viral se transcriben en ADN complementario (ADNc) y se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Las sondas marcadas con fluorescencia se aparean con fragmentos de ADN amplificados y la intensidad de la señal fluorescente es monitoreada por el instrumento 7500 Fast Dx de ABI durante cada ciclo de PCR. La amplificación del objetivo se registra como aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en comparación con la señal de fondo.

También se incluye una mezcla de virus como control positivo que consiste de DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241 inactivados con calor. Un control de muestra humana (Human Specimen Control, HSC) es un material no infeccioso de células humanas cultivadas que proporciona una señal positiva en el ensayo y demuestra una recuperación exitosa de ARN, así como la integridad del reactivo de extracción de ARN. El ARN de la RNasa P (RP) humano está presente en el material de células cultivadas y en la mayoría de las muestras clínicas; es detectable mediante RT-PCR en tiempo real usando los oligonucleótidos iniciadores y sondas proporcionados. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se puede realizar en singleplex (cada serotipo DENV se detecta con una reacción separada) o en multiplex (los cuatro serotipos DENV se analizan en la misma reacción). Estos dos formatos ofrecen la misma sensibilidad.



3.

Resumen del proceso de pruebas para el dengue



* El ARN diluido es opcional. Siempre incluya el control de ARN sin diluir.



4. MATERIALES SUMINISTRADOS

Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC:

- 1- Prospecto/Instrucciones de uso (este manual)
- 2- Caja 1: Estuche de detección (conjunto de oligonucleótidos iniciadores y sonda)
- 3- Caja 2: Estuche de control positivo (una mezcla de estándares de DENV-1, 2, 3 y 4 inactivados por calor)
- 4- Caja 3: Control de extracción de muestra humana (HSC)

Caja 1: Estuche de detección (conjuntos de oligonucleótidos iniciadores y sonda)

(Almacenar a 2-8 °C en el área de preparación de reactivos para PCR.

Cada oligonucleótido se proporciona por separado en forma de gránulos liofilizados a rehidratarse en 0.1 ml)

Etiqueta	N.º de pieza	Descripción	Cantidad/vial	Reacciones /vial
D1-F	SO3504	Oligonucleótido iniciador directo de DENV-1	5 nmol	200
D1-R	SO3505	Oligonucleótido iniciador indirecto de DENV-1	5 nmol	200
D2-F	SO3507	Oligonucleótido iniciador directo de DENV-2	5 nmol	200
D2-R	SO3508	Oligonucleótido iniciador indirecto de DENV-2	5 nmol	200
D3-F	SO3510	Oligonucleótido iniciador directo de DENV-3	5 nmol	200
D3-R	SO3511	Oligonucleótido iniciador indirecto de DENV-3	5 nmol	200
D4-F	SO3513	Oligonucleótido iniciador directo de DENV-4	5 nmol	200
D4-R	SO3514	Oligonucleótido iniciador indirecto de DENV-4	5 nmol	200



RP-F	SO2669	Oligonucleótido iniciador directo de Rnasa P	5 nmol	200
RP-R	SO2670	Oligonucleótido iniciador indirecto de RNasa P	5 nmol	200
Sonda D1	SO3506	Sonda de DENV-1	1 nmol	200
Sonda D2	SO3509	Sonda de DENV-2	1 nmol	200
Sonda D3	SO3512	Sonda de DENV-3	1 nmol	200
Sonda D4	SO3515	Sonda de DENV-4	1 nmol	200
Sonda RP	SO3516	Sonda de RNasa P	1 nmol	200



Caja 2: Estuche de control positivo (mezcla de DENV-1, 2, 3 y 4 estándares inactivados con calor)
(Almacenar a 2-8 °C en el área de manejo de ARN)

Etiqueta del reactivo	N.º de pieza	Descripción	Cant./ Tubo	Cant. de tubos
Control de DENV-1-4	SO3532	Mezcla de los serotipos 1-4 del virus del dengue para uso como control positivo en el procedimiento del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC para asegurar la detección de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La mezcla de los serotipos 1-4 contiene DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241 inactivados con calor.	Gránulos liofilizados a rehidratarse en 1 ml	4

Caja 3: Control de extracción de muestra humana
(Almacenar a 2-8 °C en el área de extracción de ácido nucleico)

Etiqueta del reactivo	N.º de pieza	Descripción	Cant./ Tubo	Cant. de tubos
HSC	HS0097	Control de muestra humana: para uso como control de procedimiento de extracción de ARN con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC para demostrar la recuperación exitosa de ARN a partir de muestras de plasma o suero humano. El ARN purificado del material de control de muestra humana debe dar un resultado positivo con el conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador de RP, y un resultado negativo con todos los marcadores específicos de DENV. El HSC consiste de material no infeccioso de células humanas cultivadas (inactivado por beta propiolactona).	Gránulos liofilizados a rehidratarse en 1 ml	4



5. MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)

5.1 Reactivos

A continuación se muestra una lista de los reactivos que no se suministran con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC. Los CDC han establecido las características de rendimiento de estos reactivos en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC. Los laboratorios nacionales deberán establecer el rendimiento de estos reactivos de acuerdo con su marco normativo local.

	Reactivos	Cantidad	N.º de catálogo
Opciones de mezcla maestra para RT-PCR en tiempo real	Sistema para PCR en tiempo real cuantitativa de un solo paso con reacciones SuperScript™ III Platinum® de Invitrogen (sin Rox)	100 reacciones	11732-020
		500 reacciones	11732-088
Opciones del kit de purificación de ácido nucleico	Minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® e instrumento Qiagen QIAcube	50 extracciones	61904 y 9001292
	Minikit de ARN Qiagen QIAamp e instrumento Qiagen QIAcube	50 extracciones	52904 y 9001292
		250 extracciones	52906 y 9001292
	Kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC de Roche	192 extracciones	03 038 505 001

5.2 Equipos y consumibles necesarios (pero no suministrados)

- Tubos de microcentrifuga de polipropileno de 1.5 ml libres de RNasa/DNasa
- Agua de grado molecular (libre de RNasa/DNasa)
- Puntas de pipeta con filtro, estériles y libre de nucleasas
- Micropipetas (1, 1-10, 10-200 y 100-1000 µl)
- Bloque frío de 96 fosas
- Microcentrifuga de mesa
- Equipo de protección personal (Personnel Protective Equipment, PPE)
- Congelador(es) a -70 °C y -20 °C
- Refrigerador a +4 °C
- Materiales y consumibles de plástico
- Etanol (EtOH) al 100%
- Solución de cloro al 10%
- Guantes desechables
- DNAzap™
- RNase AWAY®
- Instrumento MagNA Pure LC 2.0 (05 197 686 001) para extracciones de ARN automatizadas con el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC



- Insumos del sistema MagNA Pure LC 2.0
- Instrumento de purificación QIAcube (9001292), opcional para extracciones de ARN usando kits de extracción de ARN de Qiagen
- Insumos del sistema de purificación QIAcube
- Instrumento de RT-PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems (4406984) con programa (software) de detección de secuencia del sistema versión 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Insumos de detección de secuencia 7500 Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Tira de 8 tubos de 0.1 ml MicroAmp™ Fast de ABI, n.º de CAT. 4358293 (requerido) o tira de 8 tapas ópticas ABI MicroAmp™, n.º de CAT. 4323032 (requerido)
- Placa óptica de PCR de 96 fosas MicroAmp™ Fast de ABI de (0.1 ml), n.º de pieza 4346906 (con código de barras) o n.º 4346907 (sin código de barras), o pieza 4366932 (alternativa para tira de 8 tubos)

6. INFORMACIÓN IMPORTANTE SOBRE VIGILANCIA Y SALUD PÚBLICA

El dengue es una enfermedad cuya declaración es obligatoria a nivel nacional en los Estados Unidos y se debe informar a los departamentos de salud a nivel estatal, local o territorial sobre casos de pacientes que hayan obtenido resultados positivos en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC o para el anticuerpo IgM anti-DENV. El personal clínico debe mantener sospecha y considerar pruebas de diagnóstico del dengue para pacientes con enfermedad febril aguda en las siguientes situaciones:

1. En las zonas endémicas de dengue de los Estados Unidos (p. ej., Puerto Rico, Islas Vírgenes, islas del Pacífico afiliadas a los EE. UU.) en pacientes con enfermedad febril aguda de 1 a 8 días de duración, con o sin signos y síntomas de dengue leve o grave.
2. Entre viajeros recién llegados de zonas tropicales con enfermedad febril aguda de 1 a 8 días de duración, con o sin signos y síntomas de dengue leve o grave.
3. Pacientes localizados en áreas de los Estados Unidos que han experimentado previamente brotes de dengue o que tienen vectores competentes de DENV (p. ej., la frontera entre EE. UU. y México, Florida) con enfermedad febril aguda con o sin síntomas de dengue leve o grave.

Los CDC ofrecen consultas y pruebas de diagnóstico de referencia para los casos de sospecha de dengue. Visite <http://www.cdc.gov/dengue> para conocer las pautas clínicas y de laboratorio.

Referencias de los CDC y de la OMS:

<http://www.cdc.gov/dengue/>

<http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/index.html>

<http://www.healthmap.org/dengue/index.php>

<http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>



7. ALMACENAMIENTO, MANEJO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

- Almacene todos los oligonucleótidos iniciadores, las sondas y los controles a 2-8 °C antes de rehidratación para su uso; almacene todos los materiales a -20 °C después de que se hayan rehidratado.
- Siempre revise la fecha de vencimiento antes del uso. No use reactivos vencidos.
- Proteja las sondas fluorogénicas de la luz.
- Los oligonucleótidos iniciadores, las sondas (incluyendo alícuotas) y la mezcla maestra de enzimas deben descongelarse y mantenerse en hielo o en bloques fríos en todo momento durante la preparación y uso.
- Los controles deben descongelarse y mantenerse en hielo en todo momento durante la preparación y el uso.

8. RECOLECCIÓN, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras que han sido recolectadas, almacenadas y/o transportadas inadecuadamente o inapropiadamente son más propensas a generar resultados falsos negativos. Es altamente recomendado que se realicen adiestramientos y capacitaciones para la colección debido a la importancia de la calidad de la muestra.

Para diagnosticar el dengue, el laboratorio requiere que se colecte una muestra de sangre durante el período agudo de la enfermedad (primeros 7 días de síntomas). Si el paciente realiza la primera visita al médico el 7.º día desde el inicio de los síntomas, o después, es probable que la muestra recolectada no genere un resultado positivo en el RT-PCR en tiempo real.

8.1 Recolección de muestras

- Una vez que se declare un diagnóstico clínico de sospecha de dengue, tome una muestra de sangre completa intravenosa.
- Siga las instrucciones del fabricante de los dispositivos para la recolección de muestras de plasma o suero para conocer los métodos de recolección, separación y almacenamiento correctos. Se recomienda que las muestras de suero o plasma separado se congelen a -20 °C y se envíen o transporten en hielo seco a los laboratorios de diagnóstico. De no haber hielo seco disponible, se recomienda que el suero o plasma separado se mantenga en hielo o en el refrigerador durante no más de 2 horas antes de que se congele a -20 °C o se realice el análisis.
- Todas las muestras de suero utilizadas para la validación del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se obtuvieron a partir de muestras de sangre recolectadas en tubos separadores de suero o con tapa roja (atigrado o rojo marmolado). Se utilizó plasma con citrato de sodio para realizar los estudios de sensibilidad analítica.

8.2 Transporte de muestras

- Asegúrese de que al transportar muestras de sangre, plasma o suero humanos se cumplan todas las normas aplicables para el transporte de muestras biológicas potencialmente infecciosas.
- Transporte/envíe las muestras de plasma o suero humano en hielo seco.



8.3 Almacenamiento de muestras

- Almacene las muestras a -20 °C al recibirlas. Descongele las muestras y manténgalas en hielo durante el procesamiento de las muestras. Almacene el remanente de la muestra a -70 °C para la conservación a largo plazo.

9. REMISIONES DE MUESTRAS A LOS CDC

- Remita todas las muestras y ARN relacionado a la Subdivisión de Dengue de los CDC utilizando el sistema de remisión más rápido disponible; preferiblemente envío de 24 hrs.
- Remita las muestras congeladas en hielo seco y las muestras no congeladas en bolsas de hielo. Remita el ARN extraído en hielo seco.
- Consulte la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (International Air Transport Association [IATA] en www.iata.org) para conocer los requisitos para la remisión de muestras biológicas humanas o potencialmente infecciosas).
- Para obtener más información acerca de la remisión de muestras, escriba a ckq2@cdc.gov. Puede obtener información sobre el envío y manejo de muestras en <http://www.cdc.gov/dengue>.

Remita las muestras al siguiente destinatario:

Jefe de Diagnóstico Molecular
Subdivisión de Dengue
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Atención: Dr. Jorge L. Muñoz-Jordán
1324 Cañada Street
San Juan, PR 00920

10. PREPARACIÓN DE CONTROLES Y REACTIVOS

10.1 Preparación de los oligonucleótidos iniciadores y las sondas

1. Tras la recepción, almacene los oligonucleótidos iniciadores liofilizados y las sondas a una temperatura entre 2 y 8 °C.
2. Rehidratación
 - a. Retire los oligonucleótidos iniciadores y sondas almacenados a una temperatura de entre 2 y 8 °C.
 - b. Transfiera mediante pipeta 0.1 ml (100 µl) de 10 mM de Tris, pH de 7.4 a 8.2, o agua de grado molecular a cada oligonucleótido iniciador y sonda liofilizada.
 - c. Permita que los oligonucleótidos iniciadores y las sondas se rehidraten totalmente durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - d. Luego de rehidratar todos los oligonucleótidos, mezcle con vortex para asegurar una solución homogénea.
3. Alícuotas



- a. Etiquete un (1) tubo estéril y libre de nucleasas para cada oligonucleótido iniciador y sonda con la siguiente información:
 - i. Nombre de la sonda o el oligonucleótido iniciador
 - ii. N.º de lote de estuche
 - iii. Fecha de vencimiento
4. Almacenamiento
 - a. Después de la rehidratación
 - i. Oligonucleótidos iniciadores
 1. Almacene las alícuotas a -20 °C o menos hasta la fecha de vencimiento, siempre y cuando se cumplan los requisitos de control de calidad.
 2. Las alícuotas descongeladas se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 8 °C durante un máximo de 3 meses.
 - ii. Sondas
 1. Las alícuotas de las sondas se almacenan a -20 °C o menos hasta la fecha de vencimiento, siempre y cuando se cumplan los requisitos de control de calidad.
 2. Las alícuotas descongeladas se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 8 °C en un lugar oscuro durante un máximo de 3 meses.

10.2 Preparación del control de muestra humana (HSC)

1. Reactivo
 - a. Material no infeccioso liofilizado de células humanas cultivadas.
2. Almacenamiento
 - a. Almacene a 2-8 °C o menos después de recibirlo.
 - b. Transfiera mediante pipeta 1 ml de agua de grado molecular a cada tubo seco. Recomendamos rehidratar un tubo a la vez y mantener los tubos secos a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta que los necesite.
 - c. Almacene a -20 °C después de la rehidratación.

10.3 Preparación de la mezcla de control positivo para DENV-1-4

1. Reactivo
 - a. Mezcla de DENV-1-4 inactivada, no infecciosa, liofilizada
 - b. Cada tubo contiene suficiente mezcla de DENV-1-4 para 7 extracciones.
2. Almacenamiento
 - a. Almacene a 2-8 °C o menos después de recibirlo.
 - b. Transfiera mediante pipeta 1 ml de agua de grado molecular a cada tubo seco. Recomendamos rehidratar un tubo a la vez y mantener los tubos liofilizados a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta que los necesite.
 - c. Almacene a -20 °C después de la rehidratación.



10.4 Preparación general

Preparación del equipo

Limpie y desinfecte todas las superficies de trabajo, pipetas, centrifugas y otros equipos antes de su uso. Se deben usar agentes de descontaminación, como Cloro al 5%, etanol al 70%, **DNAzap™** o **RNase AWAY®** para reducir al mínimo el riesgo de contaminación del ácido nucleico.

Reactivos para RT-PCR en tiempo real

- Coloque la mezcla maestra PCR 2X de Invitrogen y la mezcla de enzimas Superscript III RT/Platinum Taq en un bloque frío, a una temperatura de entre 4 y 8 °C.
- Descongele completamente el vial de la muestra maestra para PCR 2X.
- Mezcle invirtiendo 10 veces la muestra maestra para PCR 2X.
- Centrifugue brevemente la mezcla maestra para PCR 2X y la mezcla de enzimas SuperScript III RT/Platinum Taq; luego, coloque en el bloque frío.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso en diagnóstico *in vitro* (IVD)
- Siga las precauciones estándar. Todas las muestras de pacientes y los controles positivos deben considerarse como potencialmente infecciosos y manejarse adecuadamente.
- No coma, beba, fume, manipule lentes de contacto ni se aplique productos cosméticos en las áreas donde se manejan reactivos y muestras humanas.
- Maneje todas las muestras como si fueran infecciosas utilizando los procedimientos de seguridad del laboratorio. Consulte el manual de Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos (BMBL), BMBL 5.ª Edición, (<http://www.cdc.gov/biosafety/>) para conocer las pautas de seguridad biológica estándar para cada procedimiento.
- El procesamiento de muestras debe realizarse en conformidad con las regulaciones nacionales correspondientes de seguridad biológica.
- Use equipo de protección personal como guantes y batas de laboratorio (entre otros) al manejar los reactivos del estuche, mientras realiza este ensayo y mientras maneje materiales incluyendo muestras, pipetas y otros equipos.
- Debido a la sensibilidad de los ensayos de RT-PCR en tiempo real, se deben tomar precauciones especiales para evitar obtener resultados positivos falsos. Se recomiendan las siguientes medidas de precaución:
 - Mantenga áreas separadas para la preparación del ensayo y el manejo de ácidos nucleicos.
 - Mantenga los equipos (p. ej., pipetas, microcentrifugas) y suministros (p. ej., tubos de microcentrifuga, puntas de pipeta) específicos separados para la preparación del ensayo y el manejo de los ácidos nucleicos extraídos.
 - Use una bata de laboratorio limpia y guantes desechables sin polvo (que no se hayan usado anteriormente) cuando prepare los ensayos.
 - Cambie los guantes entre muestras y cada vez que se sospeche de contaminación.



- Mantenga el reactivo y los tubos de reacción tapados o cubiertos tanto como sea posible.
- Las superficies de trabajo, pipetas y centrifugas deben limpiarse y descontaminarse con productos de limpieza como hipoclorito de sodio al 5-10%, *DNAzap™* o *RNase AWAY* para minimizar el riesgo de contaminación del ácido nucleico. El hipoclorito de sodio residual debe eliminarse con etanol al 70%.
- Los reactivos, la mezcla maestra de RT-PCR y el ARN se deben mantener en el bloque frío durante su preparación y/o uso para asegurar su estabilidad.
- Siempre revise la fecha de vencimiento de cada reactivo antes de uso. No use reactivos vencidos.
- Proteja las sondas fluorogénicas de la luz.
- Los oligonucleótidos iniciadores, las sondas (incluyendo las alícuotas) y la mezcla de enzimas deben descongelarse y mantenerse en hielo o en bloques fríos en todo momento durante la preparación y el uso.
- Deseche los reactivos del estuche no utilizados y las muestras humanas de acuerdo con las regulaciones locales, estatales y federales.

12. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO (ARN)

El rendimiento del ensayo de RT PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC depende de la cantidad y la calidad del ARN viral purificado a partir de muestras humanas. Los siguientes procedimientos y estuches de extracción de ARN comercialmente disponibles han sido calificados y validados para la recuperación y pureza del ARN de DENV para uso con el ensayo:

1. Minikit de ARN. Estos procedimientos de extracción de ARN se pueden realizar manualmente o en el instrumento QIAcube (9001292).
2. Kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC de Roche (03-038 505 001) para la extracción de ARN viral en el MagNA Pure LC de Roche 2.0 (05 197 686 001). Este procedimiento se debe realizar solo con los productos del sistema MagNA Pure de Roche.
3. Almacene el ARN extraído a -20 °C si la PCR se realizará dentro de las 24 horas; de lo contrario, mantenga el ARN restante almacenado a -80 °C.

Exención de responsabilidad: los procedimientos recomendados por el fabricante deben ser utilizados para la extracción de muestras y controles con cualquiera de los 2 procedimientos de extracción de ARN anteriormente mencionados. Los nombres de los proveedores o fabricantes se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados. La inclusión de dichos nombres no implica respaldo comercial alguno por parte de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

13. PREPARACIÓN DEL ENSAYO

13.1 Preparación de la mezcla maestra/preparación de la placa

Prepare la mezcla maestra de acuerdo con las siguientes tablas.



Nota: es necesario preparar un exceso de mezcla maestra de reacción por la posibilidad de error de pipeteo.

Ejemplo: *si la cantidad de muestras (n), incluidos los controles = 1-14, entonces $N = n+1$*

Si la cantidad de muestras (n), incluidos los controles >15, entonces $N = n+2$



Ejemplo de reacción en modo singleplex (cualquier serotipo)*

Reactivo	Volúmen	Volúmen/ reacción	Total de cantidad de reacciones (N=10+1)	Volúmen total
Agua libre de nucleasas	5.55 µl	N x 5.55 µl	N = 10 + 1 = 11	61.05 µl
2X PCR Master Mix	12.5 µl	N x 12.5 µl	N = 10 + 1 = 11	137.5 µl
Oligonucleótido iniciador delantero	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador complementario	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Sonda DENV	0.45 µl	N x 0.45 µl	N = 10 + 1 = 11	4.95 µl
SuperScript™ III Mezcla RT/Platinum® Taq Mix	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Volúmen total	20 µl	N x 20 µl		220 µl

*Para completar el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en modo singleplex, se deben realizar cuatro reacciones separadas, una para cada serotipo.

Ejemplo de reacciones para DEN-1, 2, 3, 4 en modo multiplex

Reactivo	Volúmen	Volúmen/ reacción	Total de cantidad de reacciones (N)	Volúmen total
Agua libre de nucleasas	2.2 µl	N x 2.2 µl	N = 10 + 1 = 11	24.2 µl
2X PCR Master Mix	12.5 µl	N x 12.5 µl	N = 10 + 1 = 11	137.50 µl
Oligonucleótido iniciador D1-F	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador D1-R	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador D2-F	0.25 µl	N x 0.25 µl	N = 10 + 1 = 11	2.75 µl
Oligonucleótido iniciador D2-R	0.25 µl	N x 0.25 µl	N = 10 + 1 = 11	2.75 µl
Oligonucleótido iniciador D3-F	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador D3-R	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador D4-F	0.25 µl	N x 0.25 µl	N = 10 + 1 = 11	2.75 µl
Oligonucleótido iniciador D4-R	0.25 µl	N x 0.25 µl	N = 10 + 1 = 11	2.75 µl
Sondas (DENV-1-4)	0.45 µl	N x 0.45 µl	N = 10 + 1 = 11	4.95 µl
SuperScript™ III Mezcla RT/Platinum® Taq Mix	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Volúmen total	20 µl	N x 20 µl		220 µl



Ejemplo de reacción para HSC

(Esta reacción se realiza por separado de cualquiera de las reacciones en modo singleplex o multiplex)

Reactivo	Volúme n	Volúmen/ reacción	Total de cantidad de reacciones (N=10+1)	Volúmen total
Agua libre de nucleasas	5.5 µl	N x 5.5 µl	N = 10 + 1 = 11	60.5 µl
2X PCR Master Mix	12.5 µl	N x 12.5 µl	N = 10 + 1 = 11	137.5 µl
Oligonucleótido iniciador RP-F	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Oligonucleótido iniciador RP-R	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Sonda RP	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
SuperScript™ III Mezcla RT/Platinum® Taq Mix	0.5 µl	N x 0.5 µl	N = 10 + 1 = 11	5.5 µl
Volúmen total	20 µl	N x 20 µl		220 µl

Prepare la mezcla en hielo y agregue la muestra ARN (templado).

- Coloque la placa para PCR en hielo.
- Agregue 20 µl de mezcla maestra a cada fosa.
- Agregue 5 µl de la muestra de extraída ARN, incluyendo las muestras de HSC.
- Selle con la tira de 8 tapas ópticas o cinta adhesiva óptica y coloque la placa en el instrumento para PCR en tiempo real ABI 7500 Fast DX de Applied Biosystems.

14. CREAR UNA PLANTILLA DE EJECUCIÓN EN EL INSTRUMENTO PARA RT-PCR EN TIEMPO REAL ABI7500 FAST DX (REQUERIDO SI NO EXISTEN PLANTILLAS)

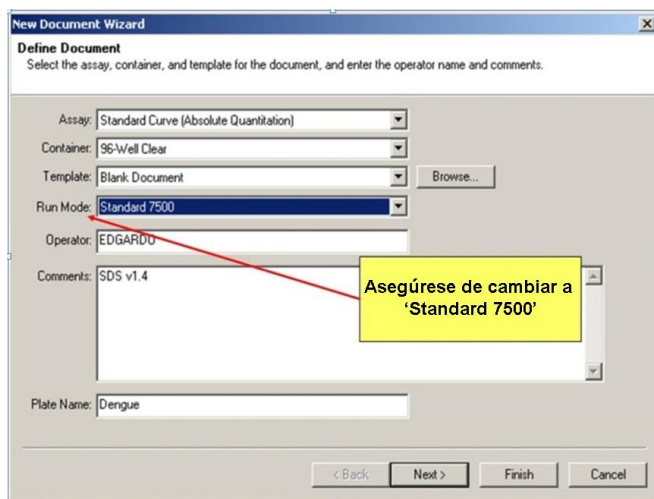
Si la plantilla ya existiera en su instrumento, pase a la sección **RUNNING A TEST** (REALIZAR UNA PRUEBA).

De lo contrario, siga el siguiente proceso:

- Inicie el programa para RT-PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx de Applied Biosystems haciendo doble pulso sobre el icono Applied Biosystems 7500 Fast Dx System.
- Aparecerá una nueva ventana donde deberá seleccionar **Create New Document** (Crear nuevo documento) en el menú.



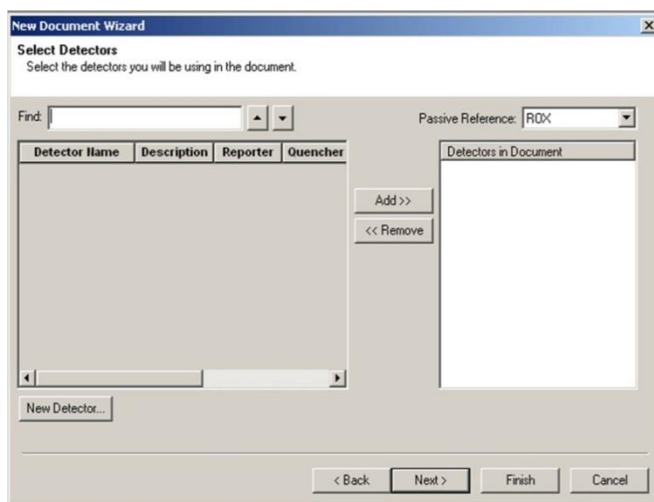
Figura 1. Ventana del asistente para nuevo documento



3. Aparecerá la pantalla **New Document Wizard** (Asistente para nuevo documento) que se muestra en la **Figura 1**. Seleccione:
 - a. Ensayo: **Curva estándar (cuantificación absoluta)**
 - b. Recipiente: **Transparente, de 96 pocillos**
 - c. Plantilla: **Documento en blanco**
 - d. Modo de ejecución: **Standard 7500 (7500 Estándar)**
 - e. Operador: **Su nombre**
 - f. Comentarios: **SSD v1.4**
 - g. Nombre de la placa: **Su elección**
4. Después de realizar las selecciones, pulse en **Next** (Siguiete) en la parte inferior de la ventana.
5. Después de seleccionar Next (Siguiete), aparecerá la pantalla **Select Detectors** (Seleccionar detectores) (**Figura 2**).
6. Haga pulse el botón **New Detector** (Nuevo detector) (consulte la **Figura 2**).



Figura 2. Crear nuevos detectores



Si va a realizar un ensayo en modo singleplex, continúe con el paso 7 en la página siguiente.

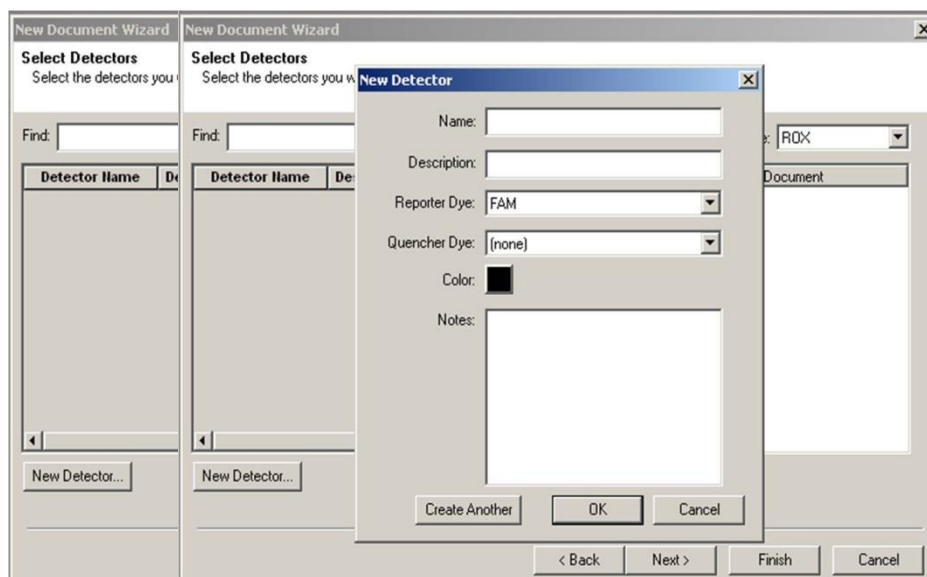
Si va a realizar un ensayo en modo multiplex, pase a la página 25.

14.1 Ensayo en modo singleplex

LOS SIGUIENTES PASOS SON ESPECÍFICOS PARA LA CREACIÓN DE PLANTILLAS DE EJECUCIÓN PARA UN ENSAYO EN MODO SINGLEPLEX

7. Aparecerá la ventana New Detector (**Figura 3**). Se deberá definir un nuevo detector para cada conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador para dengue. La preparación de estos detectores le permitirá analizar cada conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador individualmente al final de la reacción.

Figura 3. Crear nuevo detector



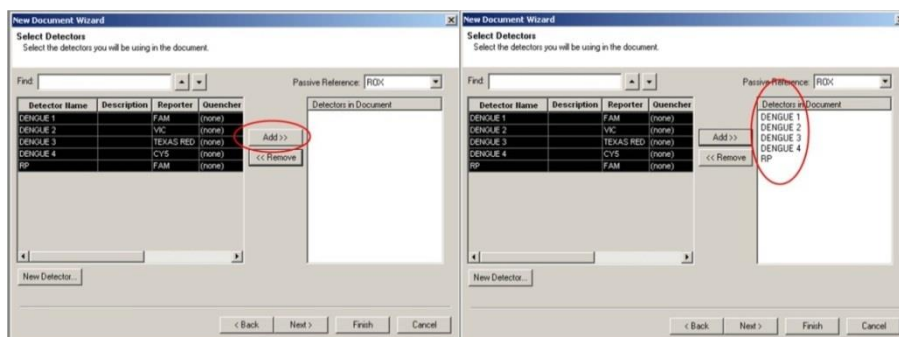
8. Comience por crear el detector de DENV-1. Incluya lo siguiente:
 - a. Nombre: **DENGUE 1**
 - b. Descripción: *deje en blanco*
 - c. Colorante activador de la fluorescencia: **FAM**
 - d. Colorante inhibidor de la fluorescencia: **(ninguno)**
 - e. Color: *para cambiar el color del indicador del detector haga lo siguiente:*
 - Pulse el cuadrado de color para ver la carta de colores.
 - Seleccione el color negro pulsando en el cuadrado negro.
 - Después de seleccionar el color, pulse **OK** (Aceptar) para volver a la pantalla New Detector.
 - f. Pulse el botón **New Detector** de la pantalla New Detector para volver a la pantalla que se muestra en la **Figura 3**. Repita los pasos 6-8 para cada serotipo de DENGUE en el ensayo. Seleccione los colores como se indica en el siguiente cuadro.

Nombre	Marcador de fluorescencia	Inhibidor de fluorescencia	Color
DENGUE 1	FAM	(NINGUNO)	NEGRO
DENGUE 2	VIC	(NINGUNO)	AZUL
DENGUE 3	ROJO TEXAS	(NINGUNO)	ROJO
DENGUE 4	CY5	(NINGUNO)	VERDE
RP	FAM	(NINGUNO)	MARRÓN

9. Después de agregar cada detector, los campos **Detector Name** (Nombre del detector), **Description** (Descripción), **Reporter** (Marcador de fluorescencia) y **Quencher** (Inhibidor de fluorescencia) se completarán en la pantalla **Select Detectors** (Seleccionar detectores) (**Figura 4**).
10. Antes de continuar, se deben agregar los detectores recientemente creados al documento. Para agregar los nuevos detectores al documento, pulse en **ADD** (AGREGAR) (consulte la **Figura 4**). Los nombres de los detectores aparecerán en el lado derecho de la ventana **Select Detectors** (**Figura 4**).

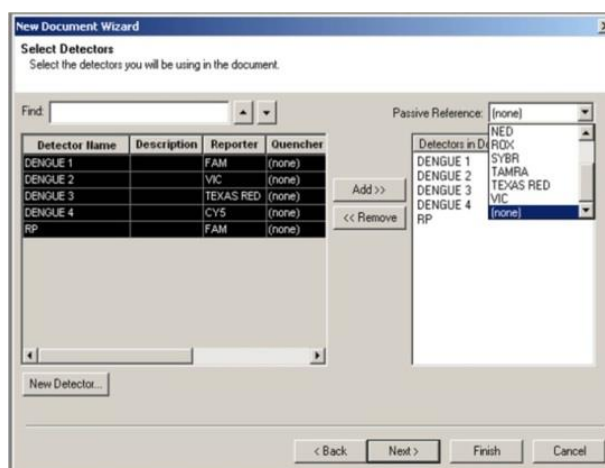


Figura 4. Agregar nuevos detectores al documento



11. Una vez que se hayan agregado todos los detectores, seleccione **(none)** (ninguno) para Passive Reference (Referencia pasiva) en la parte superior derecha del menú desplegable (Figura 5).

Figura 5. Seleccionar la referencia pasiva



12. Pulse **Next** en la parte inferior de la ventana **Select Detectors** para pasar a la ventana **Set Up Sample Plate** (Preparar templado de muestras en la placa) (Figura 6).
13. En la ventana **Set Up Sample Plate** (Figura 6), seleccione sombreando la fila A de la tabla que se encuentra en la parte inferior de la ventana (consulte la Figura 6).
14. Luego, en la parte superior de la ventana, seleccione el detector **DENGUE 1**. Aparecerá una marca de verificación al lado del detector que haya seleccionado (Figura 6). También aparecerá un icono de una "U" en cada celda seleccionada indicando que el detector ha sido seleccionado.
15. Repita los pasos 14-15 para cada detector que se utilizará en el ensayo.



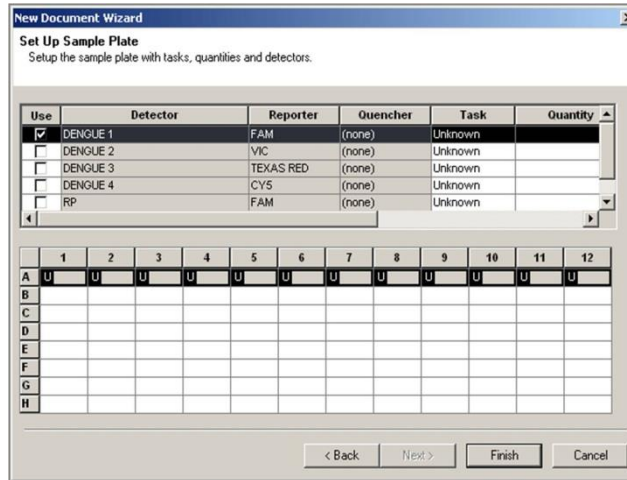
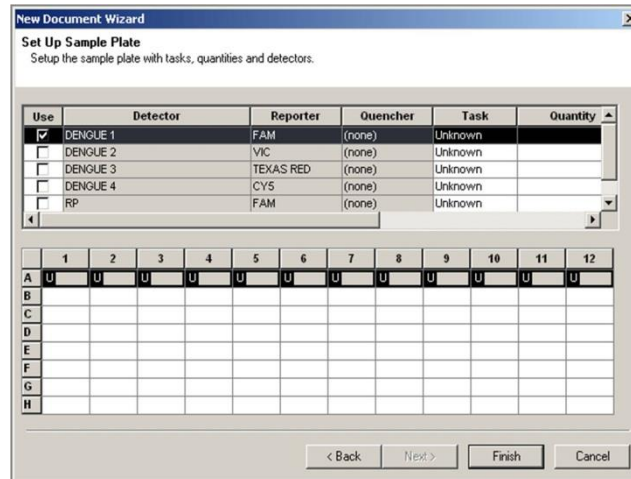
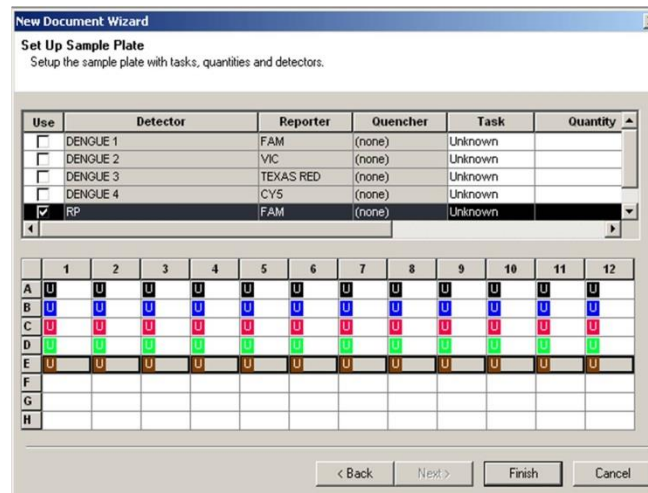


Figura 6. Preparación de la placa de muestra



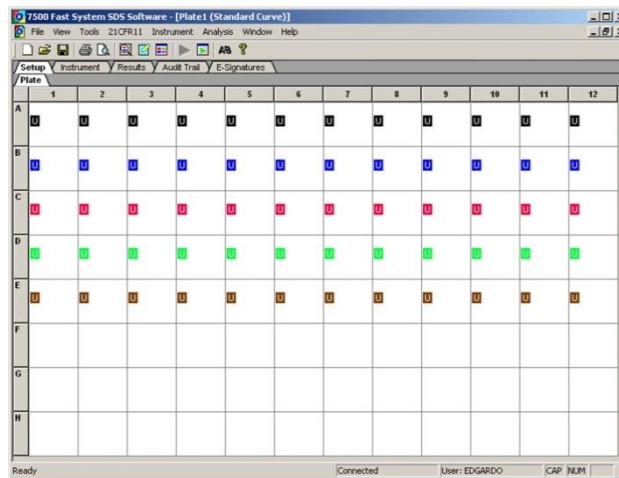
16. Seleccione **Finish** (Terminar) después de que los detectores hayan sido asignados a sus respectivas columnas (Figura 7).

Figura 7. Preparación de la placa de muestra



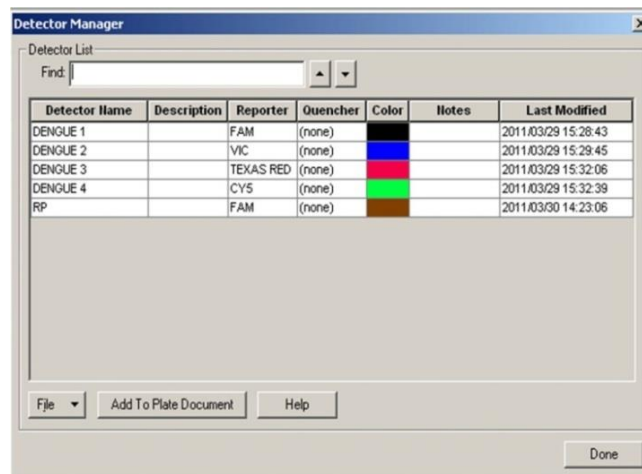
17. Después de pulsar **Finish**, habrá una breve pausa para permitir la inicialización del sistema ABI 7500 Fast Dx de Applied Biosystems. Después de la inicialización, se escuchará un sonido clic. **Nota: la máquina debe estar encendida para que se realice la inicialización.**
18. Después de la inicialización, aparecerá la pestaña **Plate** (Placa) de la ventana **Set up** (Preparar) (Figura 8).
19. Cada fosa de la placa debe contener iconos de U en color que se correspondan con los marcadores de los detectores que fueron elegidos anteriormente. Para confirmar las asignaciones del detector, seleccione **Tools** (Herramientas) en el menú de archivo; luego, seleccione **Detector Manager** (Administrador de detectores).

Figura 8. Ventana de preparación de la placa



20. Aparecerá la ventana **Detector Manager** (Figura 9).

Figura 9. Ventana del administrador de detectores



21. Confirme que todos los detectores de dengue estén incluidos y que cada serotipo de dengue tenga un **Reporter** (Marcador de fluorescencia) establecido para el marcador de fluorescencia correspondiente y que el **Quencher** (Inhibidor de fluorescencia) esté establecido en (**none**) (ninguno).
22. Si todos los detectores están incluidos, seleccione **Done** (Listo). Se ha creado la información del detector y se ha asignado a las fosas correspondientes en la placa.

Continúa en la página 32.

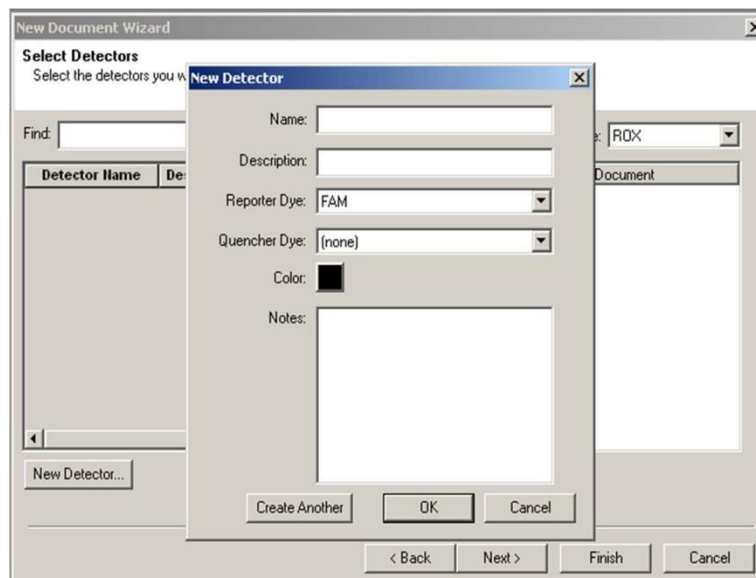


14.2 Ensayo en modo multiplex

LOS SIGUIENTES PASOS SON ESPECÍFICOS PARA LA CREACIÓN DE PLANTILLAS DE EJECUCIÓN PARA UN ENSAYO EN MODO MULTIPLEX

7. Aparecerá la ventana New Detector (Nuevo detector) (**Figura 10**). Se deberá definir un nuevo detector para cada conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador para dengue. Crear estos detectores le permitirá analizar cada conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador individualmente al final de la reacción.

Figura 10. Crear nuevo detector



8. Comience por crear el detector de DENV-1. Incluya lo siguiente:
 - a. Nombre: **DENGUE 1**
 - b. Descripción: *deje en blanco*
 - c. Colorante activador de la fluorescencia: **FAM**
 - d. Colorante inhibidor de la fluorescencia: **(ninguno)**
 - e. Color: *para cambiar el color del indicador del detector haga lo siguiente:*
 - f. Pulsar el cuadrado de color para ver la carta de colores.
 - g. Seleccione el color negro pulsando el cuadrado negro.
 - h. Después de seleccionar el color, pulse **OK** (Aceptar) para volver a la pantalla New Detector.
 - i. Pulse el botón **New Detector** de la pantalla New Detector para volver a la pantalla que se muestra en la **Figura 10**.
9. Repita los pasos 6-8 para cada serotipo de DENGUE en el ensayo. Seleccione los colores como se indica en el siguiente cuadro.

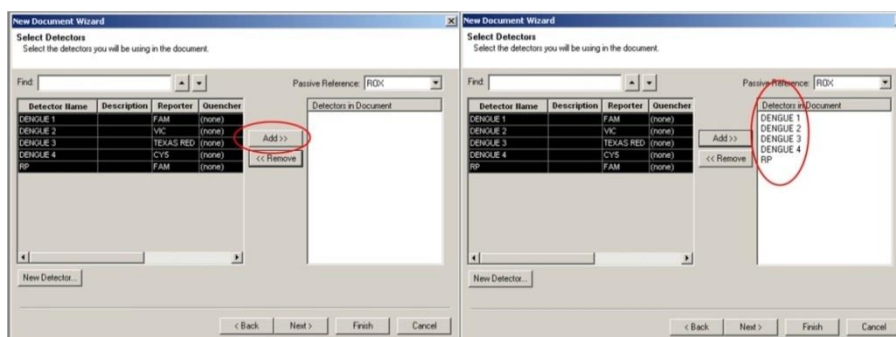


Nombre	Marcador de fluorescencia	Inhibidor de fluorescencia	Color
DENGUE 1	FAM	(NINGUNO)	NEGRO
DENGUE 2	VIC	(NINGUNO)	AZUL
DENGUE 3	ROJO TEXAS	(NINGUNO)	ROJO
DENGUE 4	CY5	(NINGUNO)	VERDE
RP	FAM	(NINGUNO)	MARRÓN

10. Después de agregar cada detector, los campos **Detector Name** (Nombre del detector), **Description** (Descripción), **Reporter** (Marcador de fluorescencia) y **Quencher** (Inhibidor de fluorescencia) se completarán en la pantalla **Select Detectors** (Seleccionar detectores) (**Figura 11**).

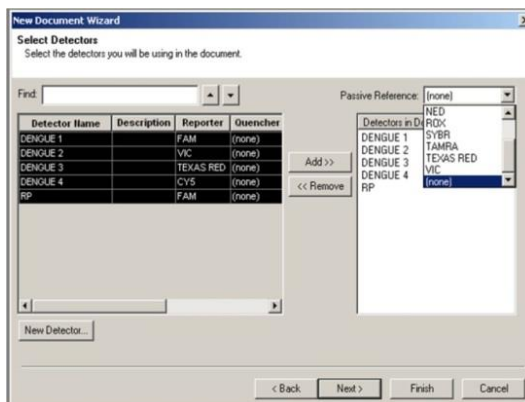
11. Antes de continuar, se deben agregar los detectores recientemente creados al documento. Para agregar los nuevos detectores al documento, pulse **ADD** (AGREGAR) (consulte la **Figura 11**). Los nombres de los detectores aparecerán en el lado derecho de la ventana **Select Detectors** (**Figura 11**).

Figura 11. Agregar nuevos detectores al documento



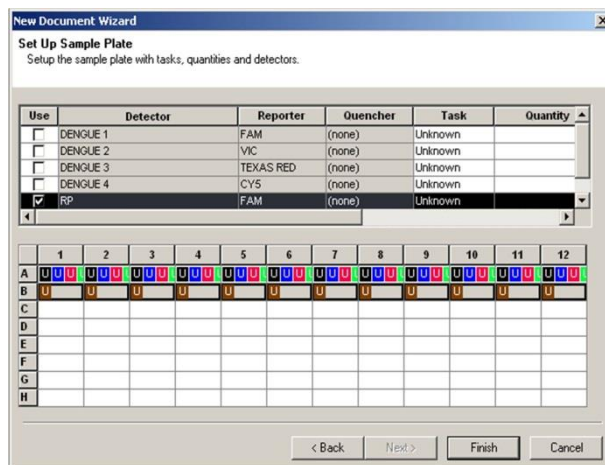
12. Una vez que se hayan agregado todos los detectores, seleccione (none) (ninguno) para Passive Reference (Referencia pasiva) en la parte superior derecha del menú desplegable (**Figura 12**).

Figura 12. Seleccionar la referencia pasiva



13. Pulse **Next** en la parte inferior de la ventana **Select Detectors (Figura 12)** para pasar a la ventana **Set Up Sample Plate** (Preparar templado de muestras en la placa).
14. En la ventana **Set Up Sample Plate (Figura 13)**, seleccione sombreando la fila A de la tabla que se encuentra en la parte inferior de la ventana (consulte la **Figura 13**).
15. Luego, en la parte superior de la ventana, seleccione el detector **DENGUE 1, DENGUE 2, DENGUE 3 y DENGUE 4**. Aparecerá una marca de verificación al lado de cada detector que haya seleccionado (**Figura 13**). También aparecerá el icono de una “U” en el color correspondiente de cada detector en cada celda seleccionada indicando que el detector ha sido seleccionado.
16. Seleccione la fila B en la parte inferior de la ventana.
17. Luego, en la parte superior de la ventana, seleccione el detector **RP**. Aparecerá una marca de verificación al lado del detector que haya seleccionado. También el icono de una “U” en color para indicar el detector RP fue seleccionado.
18. Repita los pasos 14-16 para cada fila correspondiente a las muestras que se colocarán en la placa.

Figura 13. Preparación de la placa de muestra

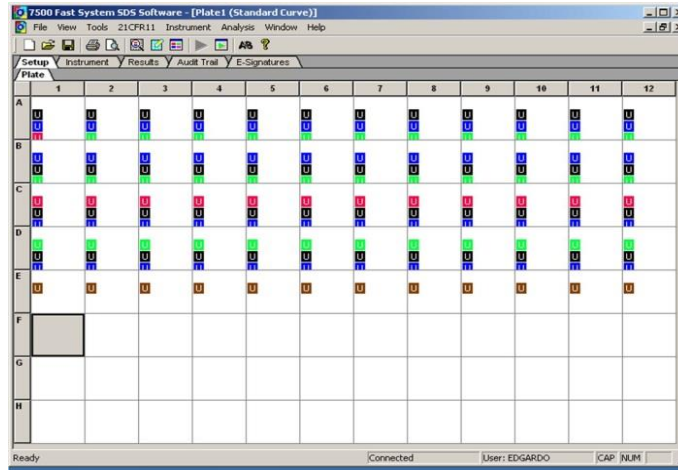


19. Seleccione **Finish** (Terminar) después de que los detectores hayan sido asignados a sus respectivas celdas.
20. Después de pulsar Finish, habrá una breve pausa para permitir la inicialización del sistema ABI 7500 Fast Dx de Applied Biosystems. Después de la inicialización, se escuchará un sonido clic. **Nota: la máquina debe estar encendida para que se realice la inicialización.**
21. Después de la inicialización, aparecerá la pestaña **Plate** (Placa) de la ventana **Set up** (Preparar) (**Figura 14**).
22. Cada pocillo de la placa debe contener iconos de U con el color que corresponda con los marcadores de los detectores que fueron seleccionados anteriormente. Para confirmar las asignaciones del



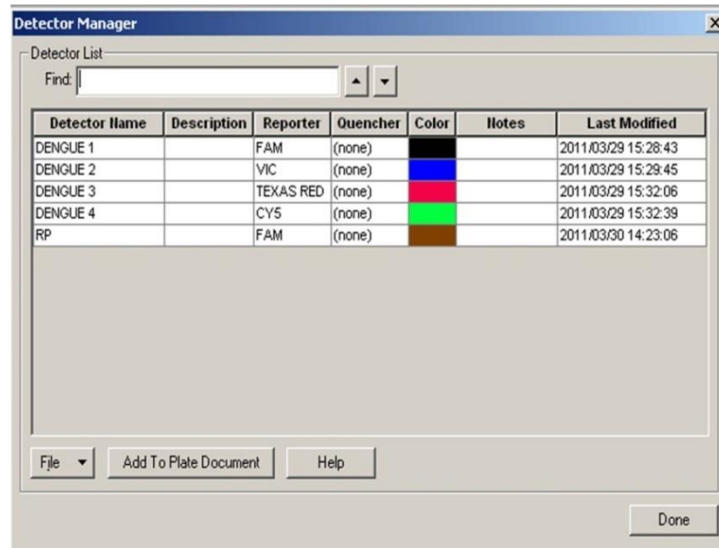
detector, seleccione **Tools** (Herramientas) en el menú de archivo; luego, seleccione **Detector Manager** (Administrador de detectores).

Figura 14. Ventana de preparación de la placa



23. Aparecerá la ventana Detector Manager (Figura 15).

Figura 15. Ventana del administrador de detectores



24. Confirme que todos los detectores de dengue estén incluidos y que cada serotipo de dengue tenga un **Reporter** (Marcador de fluorescencia) establecido para el Marcador de fluorescencia correspondiente y que el **Quencher** (Inhibidor de fluorescencia) esté establecido en **(none)** (ninguno).

25. Si todos los detectores están incluidos, seleccione **Done** (Listo). Se ha creado la información del detector y se ha asignado a las fosas de la placa.

Continúa en la siguiente página.



15. DEFINICIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DEL INSTRUMENTO

1. Después de que los detectores hayan sido creados y asignados, pase a la configuración del instrumento.
2. Seleccione la pestaña **Instrument** (Instrumento) para definir las condiciones de ciclado térmico.
3. Modifique las condiciones de ciclado térmico de la siguiente manera (**Figura 16**):
 - a. En Stage 1 (Etapa 1), defina en **30 min. a 50 °C; 1 rep.**
 - b. En Stage 2, defina en **2.0 min. a 95 °C; 1 rep.**
 - c. En Stage 3, defina el Step 1 en **15 seg. a 95 °C**
 - d. En Stage 3, defina el Step 2 en **1 min. a 60.0 °C**
 - e. En Stage 3, Reps se deberán cambiar a **45 repeticiones**
 - f. Debajo de **Settings** (Configuración) (**Figura 16**), en el cuadro inferior izquierdo, cambie el volúmen de muestra a 25 µl.
 - g. Debajo de **Settings**, para **Run Mode** (Modo de ejecución), se deberá seleccionar **Standard 7500** (7500 Estándar).
 - h. En Step 2 del Stage 3 deberá quedar resaltado en amarillo para indicar la recolección de datos (consulte la **Figura 16**).

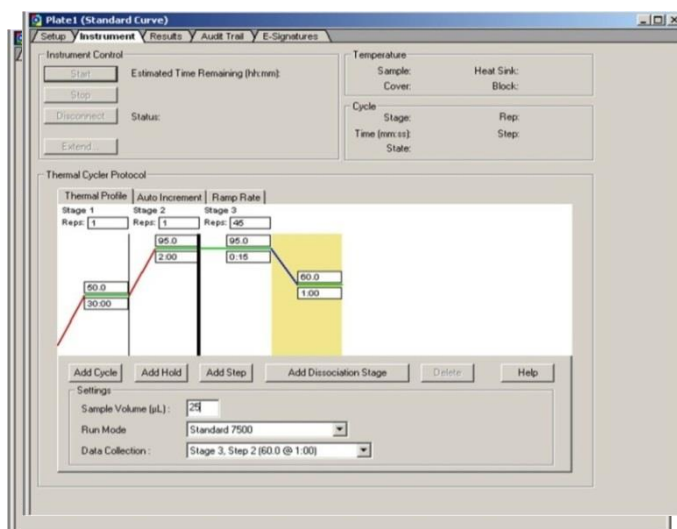
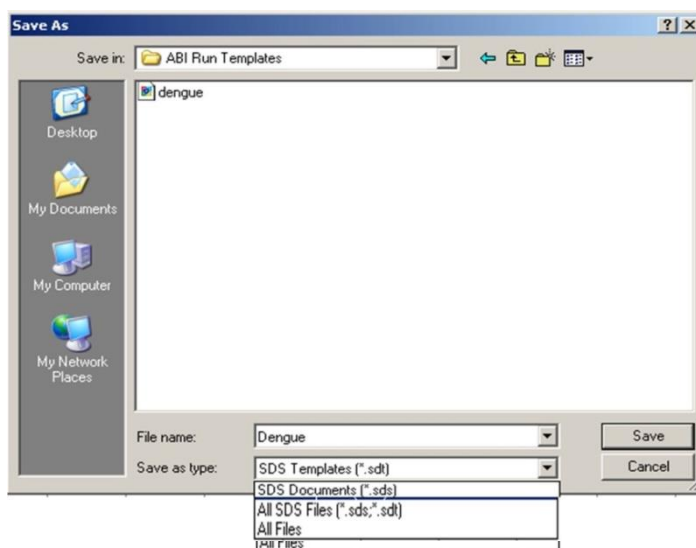


Figura 16. Ventana del instrumento



- Después de realizar cambios en la pestaña **Instrument**, el archivo de plantilla está listo para ser salvado. Para salvar la plantilla, seleccione **File** (Archivo) en el menú superior, luego, seleccione **Save As** (Guardar como).
- Salve la plantilla como **Dengue** en el directorio “**ABI Run Templates**” (Plantillas de ejecución de ABI) (deberá crear este directorio). La plantilla se deberá salvar con la extensión de plantillas SDS (*.sdt). (**Figura 17**).

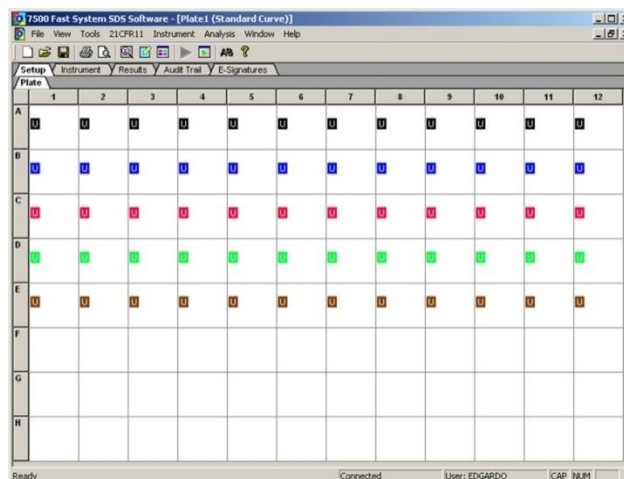
Figura 17. Salvar plantilla



16. REALIZAR UN ANÁLISIS

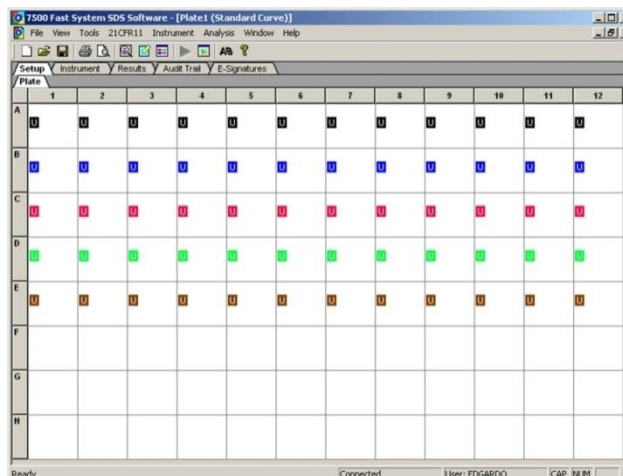
- Encienda el instrumento para RT-PCR en tiempo real ABI 7500 Fast DX
- Inicie el programa para RT-PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de Applied Biosystems pulsando el icono 7500 Fast Dx System (Sistema 7500 Fast Dx).
- Aparecerá una nueva ventana, seleccione **Open Existing Document** (Abrir documento existente) en el menú.
- Navegue para seleccionar y entre en el directorio “ABI Run Template”.
- Seleccione y pulse el archivo de plantilla **Dengue**.
- Habrá una breve pausa para permitir la inicialización del sistema ABI 7500 Fast Dx de Applied Biosystems. Después de la inicialización, se escuchará un sonido clic. **Nota: la máquina debe estar encendida para que se realice la inicialización.**





- Después de la inicialización del instrumento, aparecerá un mapa de la placa de PCR (**Figura 18**). Los detectores y controles ya deberían estar etiquetados tal como fueron asignados en la plantilla original.

Figura 18. Ventana de preparación de la placa




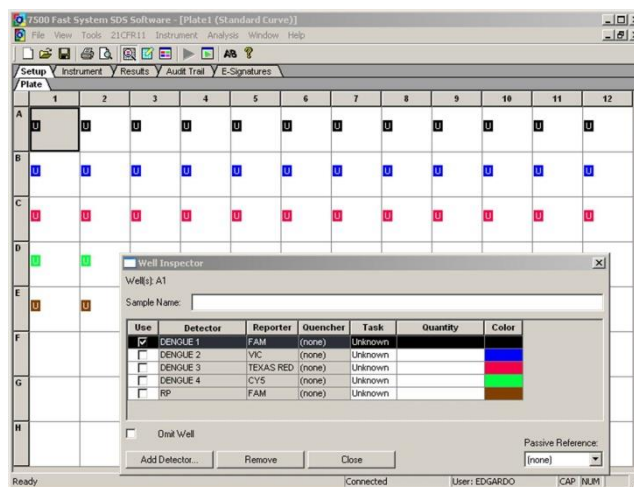
- Puse el icono **Well Inspector** (Inspector de fosas)  en el menú superior.
- Sombree seleccionando las fosas con las muestras de interés en el mapa de la placa de PCR.
- Entre los identificadores de muestra en **Sample Name** (Nombre de la muestra) en la ventana **Well Inspector** (consulte la **Figura 19**).

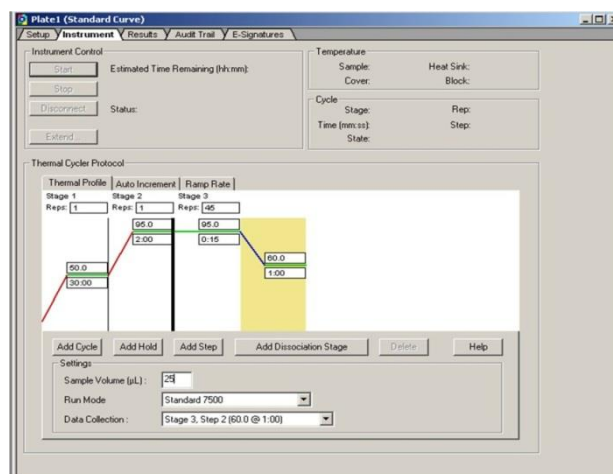


Figura 19. Etiquetado de las fosas



11. Repita los pasos 9-10 hasta que se hayan agregado todos los identificadores de muestra a la preparación de la placa.
12. Una vez que se hayan agregado todos los identificadores de muestra y control, pulse el botón **Close** (Cerrar) en la ventana **Well Inspector** para volver a la pestaña de preparación de **Plate** (Placa).
13. Pulse la pestaña **Instrument** en la esquina superior izquierda.
14. Ya deberían haberse cargado las condiciones de reacción, los volúmenes y el tipo de reacción de 7500 (**Figura 20**).

Figura 20. Configuración del instrumento



15. Asegúrese de que la configuración sea correcta (consulte la sección *Definir la configuración del instrumento*).



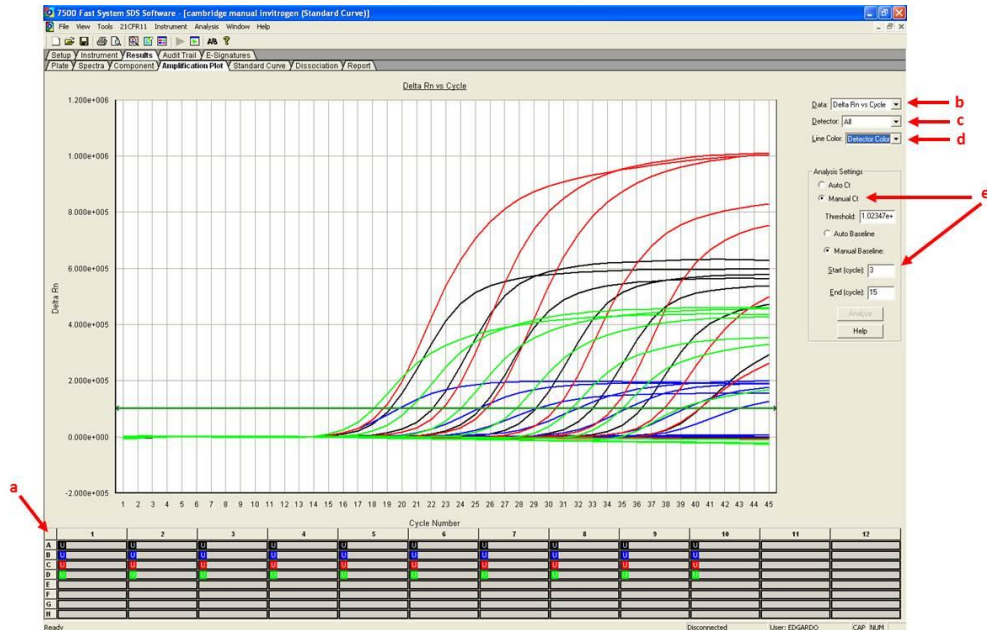
16. Antes de continuar, se deberá salvar el archivo de ejecución; en el menú principal, seleccione **File** (Archivo), luego **Save As (Salvar como)**. Salve el archivo en el directorio correspondiente previamente creado.
17. Una vez que se guarda el archivo de ejecución, pulse el botón **Start** (Inicio). *Nota: la ejecución deberá completarse en aproximadamente 2 horas.*



17. ANÁLISIS DE DATOS

1. Después de que haya finalizado la ejecución, seleccione la pestaña **Results** (Resultados) en la esquina superior izquierda del programa.
2. Seleccione la pestaña **Amplification Plot** (Gráfico de Amplificación) para ver los datos sin procesar (**Figura 21**).

Figura 21. Ventana del gráfico de amplificación

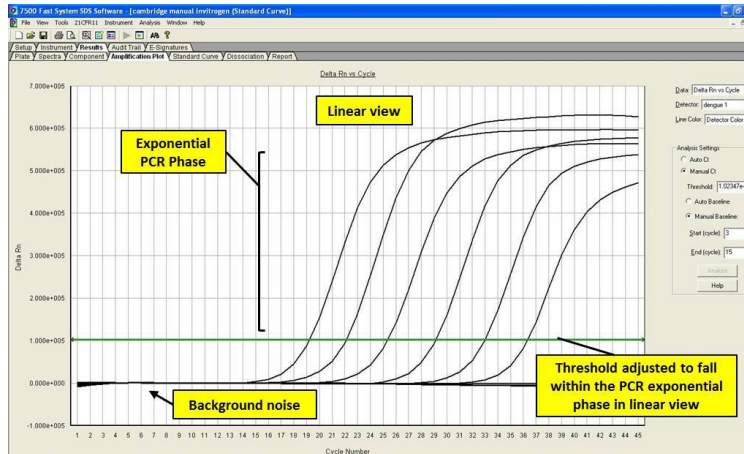


3. Comience seleccionando todas las muestras de la ejecución; para ello, pulse el cuadro superior izquierdo (**a**) de las fosas de muestras (**Figura 21**). Todas las curvas de amplificación deben aparecer en el gráfico.
4. En la parte derecha de la ventana, (**b**) el menú desplegable **Data** (Datos) debe configurarse en **Delta Rn vs Cycle** (Ejecución Delta versus Ciclo).
5. Seleccione **DENGUE 1** en el (**c**) menú desplegable **Detector** mediante la flecha hacia abajo.
 - a. Tenga en cuenta que cada detector se analiza individualmente para reflejar los diferentes perfiles de rendimiento de cada conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador.
6. En el menú desplegable **Line Color** (Color de línea), se debe seleccionar (**d**) **Detector Color** (Color del detector).
7. En la sección de **Analysis Settings** (Configuración de análisis), seleccione **Manual Ct** (Ct manual) (**e**).



- a. No cambie los valores predeterminados **Manual Baseline** (Inicio manual). Pulse y arrastre la línea del umbral de color rojo hasta que se encuentre dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de fondo (**Figura 22**).

Figura 22. Gráfico de amplificación



- 8. Pulse el botón **Analyze** (Analizar) en la esquina inferior derecha de la ventana. La línea del umbral de color rojo se volverá verde, lo que indica que los datos han sido analizados.
- 9. Repita los pasos 5-9 para analizar los resultados generados para cada conjunto de marcadores (es decir, DENGUE 1, DENGUE 2, DENGUE 3, DENGUE 4, RP).
- 10. Sáve el archivo de análisis seleccionando **File**, luego, seleccione **Save As** en el menú principal.
- 11. Después de completar el análisis para cada uno de los marcadores, seleccione la pestaña **Report** (Informe) encima del gráfico para ver los valores de Ct. Para filtrar el informe por nombre de muestra en orden ascendente o descendente, simplemente pulse en **Sample Name** (Nombre de la muestra) en la tabla (**Figura 23**).

Figura 23. Informe

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	-2 den 1	dengue 1	Unknown	19.2846						
A2	-3 den 1	dengue 1	Unknown	22.6259						
A3	-4 den 1	dengue 1	Unknown	26.5506						
A4	-5 den 1	dengue 1	Unknown	30.2553						
A5	-6 den 1	dengue 1	Unknown	33.9109						
A6	-7 den 1	dengue 1	Unknown	Undet.						
A7	-8den 1	dengue 1	Unknown	37.4871						
A8	-9 den1	dengue 1	Unknown	Undet.						
A9	neg	dengue 1	Unknown	Undet.						
A10	pos	dengue 1	Unknown	16.6605						
B1	-2 den 2	dengue 2	Unknown	21.2554						
B2	-3 den 2	dengue 2	Unknown	24.4357						
B3	-4 den 2	dengue 2	Unknown	27.298						
B4	-5den 2	dengue 2	Unknown	31.2636						
B5	-6den 2	dengue 2	Unknown	35.2831						
B6	-7 den 2	dengue 2	Unknown	38.1364						
B7	-8 den 2	dengue 2	Unknown	Undet.						
B8	-9 den 2	dengue 2	Unknown	Undet.						



18. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

18.1 Resultados de control y extracción e interpretación

Control sin plantilla (NTC)

El NTC consiste en el uso de agua libre de nucleasas en las reacciones de RT-PCR en tiempo real en lugar de usar ARN. Las reacciones de NTC no deben presentar curvas de amplificación que crucen la línea del umbral en ninguno de los conjuntos de oligonucleótidos iniciadores y sondas. Si alguna de las reacciones de NTC presenta una curva de amplificación que cruce el umbral del ciclo, es posible que la muestra se haya contaminado. Invalide la ejecución y repita el ensayo siguiendo estrictamente las pautas previamente establecidas al pie de la letra.

Control positivo de DENV-1-4

El control positivo consiste en una mezcla del virus del dengue DENV-1, 2, 3 y 4 obtenida a partir del sobrenadante de cultivo en células C6/36. El ARN purificado obtenido a partir del control positivo producirá un resultado positivo con los siguientes conjuntos de oligonucleótidos iniciadores y sondas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

Control de muestra humana (HSC) (control de extracción)

El control de HSC consiste en material no infeccioso derivado de células humanas cultivadas (A549). El HSC se utiliza como un control del procedimiento de extracción de ARN para demostrar la recuperación exitosa de ARN, así como la integridad del reactivo de extracción. El ARN purificado del HSC debe producir un resultado positivo con el conjunto de sonda y oligonucleótido iniciador de RP, y un resultado negativo con todos los marcadores específicos del dengue.

RNasa P (RP)

- Todas las muestras clínicas deben presentar curvas de amplificación en la reacción de RP que cruce la línea de umbral en 37 ciclos o menos (<37 Ct), lo que indica la presencia del gen de la RNasa P humana.
- Una falla en la detección de la RP en alguna muestra clínica puede indicar lo siguiente:
 - Extracción inadecuada del ácido nucleico a partir de materiales clínicos resultando en la pérdida de ARN y/o degradación del ARN.
 - Ausencia de suficiente material celular humano debido a una mala recolección o la pérdida de la integridad de la muestra.
 - Preparación y ejecución incorrecta del ensayo.
 - Mal funcionamiento del equipo o de algún reactivo.

Si el ensayo de RP falla en producir un resultado positivo en muestras clínicas humanas, interprete de la siguiente manera:

- Si se producen resultados positivos para DENV-1, 2, 3 y 4, incluso en ausencia de señal de RP, el resultado para el dengue se debe considerar válido. Es posible que algunas muestras no presenten



curvas de amplificación de RP debido a la presencia de bajos niveles de RP en la muestra clínica original. Una señal de RP negativa no excluye la presencia del virus del dengue en una muestra clínica.

- Si todos los marcadores de dengue y la RP son negativos para una muestra, el ensayo se considera “no concluyente” para la muestra. Si se dispone de muestra remanente, repita el procedimiento de extracción y realice la prueba nuevamente. Si todos los marcadores siguen resultando negativo después de volver a realizar la prueba, informe los resultados como “no concluyentes” y de ser posible, se deberá obtener una nueva muestra.

El ensayo de RP puede ser negativo cuando se prueban muestras de virus a partir de cultivo celular.

Marcadores de DENV (DENV-1, 2, 3 y 4)

- Cuando todos los controles presentan el rendimiento esperado, una muestra se considera negativa si las curvas de amplificación de los marcadores de DENV NO cruzan la línea del umbral antes de 37 ciclos (<37 Ct) y la curva de amplificación de RP sí atraviesa la línea del umbral antes de 37 ciclos (<37 Ct).
- Cuando todos los controles presentan el rendimiento esperado, una muestra se considera positiva para DENV-1, 2, 3 o 4 si la curva de amplificación de los marcadores de DENV (p. ej., DENV-1, 2, 3 o 4) cruza la línea del umbral antes de 37 ciclos (<37 Ct). Si en una muestra, más de un marcador de DENV cruza la línea del umbral antes de 37 ciclos (<37 Ct), el ARN extraído de la muestra se debe volver a someter a prueba. Si no se dispusiera de ARN remanente, vuelva a extraer el ARN de la muestra remanente y repita la prueba. Si la muestra que se volvió a someter a prueba sigue siendo positiva para dos marcadores de DENV y todos los controles presentan el rendimiento esperado, el resultado podrá indicar “infección doble con DENV”. Las infecciones dobles se han reportado anteriormente pero no son frecuentes. Si existe una indicación de infección doble, la muestra se deberá enviar a la Subdivisión de Dengue de los CDC para que se realicen pruebas confirmatorias (correo electrónico: ckq2@cdc.gov).
- Cuando todos los controles presentan el rendimiento esperado y ninguna de las curvas de amplificación de los marcadores de DENV ni el marcador de RP cruzan la línea del umbral antes de 37 ciclos (<37 Ct), el resultado es “no concluyente”. Se deberá volver a someter a prueba el ARN extraído de la muestra. Si no se dispusiera de ARN remanente, vuelva a extraer el ARN de la muestra remanente y repita la prueba. Si la muestra que se volvió a someter a prueba es negativa para todos los marcadores y todos los controles presentan el rendimiento esperado, el resultado es “no concluyente” y de ser posible, se deberá recolectar una nueva muestra.



19. GUÍA DEL USUARIO PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DENV-1-4 DE LOS CDC REFERENCIA RÁPIDA Y PRESENTACIÓN DE INFORMES

DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Objetivo de RP	Informe
+	-	-	-	±	Detección positiva de DENV-1*
-	+	-	-	±	Detección positiva de DENV-2*
-	-	+	-	±	Detección positiva de DENV-3*
-	-	-	+	±	Detección positiva de DENV-4*
-	-	-	-	+	Negativo para DENV, el resultado no excluye la infección
-	-	-	-	-	Prueba no concluyente, probablemente debido a una falla en la extracción o una pobre calidad de muestra**

* Si la muestra resulta positiva para 2 serotipos, repita la prueba, como se indica más arriba. Si la muestra resulta repetidamente reactiva para ambos serotipos, el resultado indica una infección doble y debe ser confirmada por la Subdivisión de Dengue de los CDC.

** Cuando se obtenga un resultado no concluyente, vuelva a extraer la muestra y someta a prueba el ARN recién extraído (recomendado) o vuelva a someter a prueba el ARN extraído.

20. CONTROL DE CALIDAD

- Los requisitos de control de calidad deben cumplirse de acuerdo con las regulaciones locales, estatales y federales o los requisitos de acreditación y los procedimientos de control de calidad estándar del laboratorio del usuario. Se recomienda que el usuario consulte el documento C24-A2 de CLSI, Control Estadístico de la Calidad para Mediciones Cuantitativas: Principios y definiciones: [Pauta aprobada, segunda edición] u otras pautas publicadas para conocer las recomendaciones generales para el control de calidad. Para obtener más información sobre las prácticas de control de calidad adecuadas, consulte 42CFR 493.1202 (c).
- Los procedimientos de control de calidad proponen controlar el rendimiento del ensayo y de los reactivos.
- Someta a prueba todos los controles positivos antes de probar las muestras de diagnóstico con cada nuevo lote de estuche para asegurarse de que todos los componentes del estuche y los reactivos funcionen correctamente.
- Según los estándares para las Buenas Prácticas de Laboratorio (cGLP), se recomienda incluir un control positivo de extracción en cada lote de aislamiento de ácidos nucleicos.
- El control de la extracción de HSC debe procesarse desde la extracción de ARN cada vez que se vaya a probar un nuevo lote de muestras clínicas.



- Siempre incluya un control negativo (NTC) y el control positivo adecuado (DENV-1-4) en cada ejecución del ensayo.

21. LIMITACIONES

- Este ensayo está sujeto a un control especial que requiere que la distribución se limite a laboratorios con (i) personal experimentado y capacitado en procedimientos estandarizados de diagnóstico molecular y experiencia en diagnóstico viral y (ii) que cuenten con contención y equipos de bioseguridad adecuados (21CFR866.3332(b)(2)).
- Los resultados negativos no excluyen que haya ocurrido una infección por virus del dengue y no deben utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo de pacientes. Se deberá volver a analizar una muestra negativa recolectada entre el 3.º y 7.º día después de la aparición de la enfermedad febril con una prueba de IgM anti-DENV; esto se realiza para aumentar la probabilidad de obtener el diagnóstico de dengue.
- Puede obtenerse un resultado negativo falso si una muestra se recolecta, transporta o maneja de forma inadecuada. La presencia de inhibidores de amplificación o una baja concentración de partículas virales pueden producir resultados negativos falsos.
- No utilice reactivos vencidos.
- No se ha establecido el desempeño de esta prueba para el monitoreo del tratamiento del dengue.
- No se ha establecido el desempeño de esta prueba para el escrutinio de donaciones de sangre o productos derivados con el fin de detectar la presencia del DENV.
- La detección de ARN viral puede no indicar la presencia de virus infecciosos o que el dengue sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- Esta prueba no descarta enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos, virales o parasitarios.
- No se han establecido las características de desempeño del ensayo para el análisis prenatal ni para el análisis de la población en general sin síntomas que correspondan a la fiebre del dengue. La prueba no está aprobada por la FDA para el análisis de donantes de sangre o plasma.

22. VALORES ESPERADOS

El porcentaje de casos positivos identificados por el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC variará dependiendo de la naturaleza del proceso de vigilancia, dado que una proporción desconocida de casos de enfermedad febril informados puede no ser dengue. Se espera que la proporción de los serotipos identificados varíe con el tiempo, el lugar y la población de pacientes. En las zonas endémicas de dengue, un serotipo suele ser más prevalente que los otros serotipos. Es posible que un serotipo no se detecte durante largos períodos y que luego vuelva a aparecer y convertirse en el serotipo predominante. Distintos países pueden tener predominio de diferentes serotipos; por lo tanto, los viajeros que regresan a los Estados Unidos procedentes de países donde el dengue es endémico pueden haber sido infectados por diferentes serotipos. Puerto Rico ha tenido presencia de los cuatro serotipos de DENV circulantes en diferentes momentos. Durante la epidemia de 2007, el DENV-2 y DENV-3 fueron los serotipos



predominantes y durante la epidemia de 2010, el DENV-1 y DENV-4 fueron predominantes. Florida sufrió una transmisión autóctona de DENV-1 en 2009 y 2010, y se han identificado casos de DENV-1, DENV-2 y DENV-4 asociados con viajes (residentes de Florida que viajaron fuera del país).

En los casos confirmados serológicamente, el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC identificó positivamente el 93% de los casos. Se obtuvo una coincidencia del 97% entre los resultados positivos obtenidos con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y con la secuenciación.

23. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

23.1 Desempeño clínico

Estudios prospectivos

Se establecieron las características de desempeño del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC durante un estudio prospectivo en 3 laboratorios de salud pública (2009-2011). Se recolectó un total de 86 muestras de suero de forma prospectiva de pacientes con fiebre y sospecha de dengue durante los primeros 5 días de síntomas; dichas muestras se sometieron a prueba en los tres centros. Veinticinco (25) y treinta y seis (36) muestras de suero se analizaron en los Centros 1 y 3, respectivamente, usando el procedimiento de extracción con el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® (n.º de CAT. 61904) y siguiendo el protocolo del fabricante. Veinticinco (25) muestras de suero se analizaron en el Centro 2 utilizando el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC de Roche (03 038 505 001). El ARN viral eluído se analizó usando el sistema para RT-PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript™ III Platinum® de Invitrogen (n.º de CAT. 11732-088) en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®. Posteriormente, las 86 muestras fueron sometidas a secuenciación bidireccional del gen de DENV E (1485 bp).



Resultados generales de comparación prospectiva

Resultados de comparación del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en modo multiplex				
		Método de referencia (secuenciación)		
		Positivas	Negativas	Total
Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC	Positivas	47	0	47
	Negativas	1*	38	39
	Total	48	38	86
		Valor	Intervalo de confianza del 95%	
Porcentaje de coincidencia positiva		97.92% (47/48)	89.10% - 99.63%	
Porcentaje de coincidencia negativa		100% (38/38)	90.82% - 100%	

*Una de las muestras resultó negativa en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC pero resultó positiva para el DENV-3 mediante la secuenciación bidireccional del gen E. Todas las demás muestras de RT-PCR en tiempo real negativas también resultaron negativas mediante la secuenciación bidireccional del gen E.

Estudios retrospectivos

Las características de desempeño del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se establecieron durante un estudio retrospectivo en la Subdivisión de Dengue de los CDC. Se obtuvieron trescientas setenta y una muestras de suero de las muestras de vigilancia del dengue de rutina de los CDC archivadas y recolectadas en pares durante el período 2007-2011. La primera muestra (fase aguda) se recolectó durante los primeros cinco días de la enfermedad y la segunda muestra (etapa de convalecencia) se obtuvo por lo menos 6 días después de la aparición de los síntomas. Estas muestras fueron analizadas con el ensayo inmunoabsorbente de captura ligado a enzima de la IgM anti-DENV (ensayo MAC-ELISA de los CDC, validado a nivel interno) a fin de establecer la seroconversión. Los resultados del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) obtenidos para las muestras de la fase aguda se compararon con los resultados de seroconversión de la IgM anti-DENV de las muestras en pares.

El ácido nucleico de todas las muestras de la fase aguda se extrajo usando el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® (n.º de CAT. 61904) y siguiendo el protocolo del fabricante. Cada muestra de ácido nucleico se analizó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) y usando el sistema para RT-PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript™ III Platinum® de Invitrogen (n.º de CAT. 11732-088) en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®. El porcentaje de coincidencia se calcula para la cantidad de muestras que obtuvieron resultados positivos o negativos en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando la seroconversión de la IgM anti-DENV como comparador. Además, se logró la secuenciación bidireccional



del gen de DENV E (1485 bp) y se corroboraron los resultados del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en todas las muestras positivas a excepción de una. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos en las 371 muestras que se originaron a partir de las siguientes fuentes: casos de dengue fuera de los Estados Unidos (n=39); casos de dengue en Puerto Rico (n=82); 250 casos negativos de Puerto Rico (sin conversión de la IgM anti-DENV).

Resultados generales de comparación retrospectiva

Resultados de comparación del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en modo multiplex				
		Método de referencia (Conversión de la IgM anti-DENV)		
		Positivas	Negativas	Total
Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC	Positivas	100*	4***	104
	Negativas	2**	265	267
Total		102	269	371
		Valor	Intervalo de confianza del 95%	
Porcentaje de coincidencia positiva		98.04% (100/102)	93.13% - 99.46%	
Porcentaje de coincidencia negativa		98.51% (265/269)	96.24% - 99.42%	

*Un caso de DENV-1 resultó positivo en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) y se confirmó su resultado positivo mediante la conversión de la IgM anti-DENV; sin embargo, la secuenciación no resultó lo suficientemente efectiva para producir un resultado interpretable. **Dos muestras resultaron negativas mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex). Una de estas muestras fue positiva para DENV-3, resultado obtenido mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex) y también confirmado mediante la secuenciación. Se confirmó que la otra muestra resultó positiva para DENV-3 mediante secuenciación. *** Cuatro muestras presentaron resultados positivos para la RT-PCR en tiempo real pero no se confirmaron mediante seroconversión de la IgM anti-DENV. Dos de estas muestras fueron positivas para DENV-3 y las otras dos muestras fueron positivas para DENV-4. Estos resultados fueron confirmados mediante secuenciación bidireccional del gen E.

23.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se evaluó en tres centros de pruebas (la Subdivisión de Dengue de los CDC y dos centros externos independientes). La reproducibilidad entre operadores, entre ejecuciones y entre centros se evaluó usando probando cinco paneles incluyendo muestras con resultados negativos, negativos altos, positivos bajos y positivos moderados. Para el desarrollo de estos paneles, se utilizaron preparaciones de virus completo, cultivado y



cuantificado (pfu/ml) (cepas DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241). Dos operadores analizaron cada muestra del panel dos veces al día durante al menos 5 días y cada operador se encargó de la ejecución de las muestras del panel dos veces al día. Los operadores de las pruebas desconocían la identidad de las muestras del panel de prueba para cada ejecución y el lote de ejnsayos a fin de garantizar que el operador no pudiera predecir los resultados del panel. Se utilizaron dos métodos de extracción de ARN validados para la RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en el estudio de reproducibilidad. La Subdivisión de Dengue de los CDC y un centro externo usaron el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® y un segundo centro externo usó el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC. Se siguieron las instrucciones de uso del fabricante incluidas en el prospecto. Los resultados generados para cada uno de los métodos de extracción se resumen en la siguiente tabla.

Estudios de reproducibilidad para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en tres centros usando el instrumento para RT-PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx de ABI y el programa SSD versión 1.4

		Centro 1			Centro 2			Centro 3		
		CT PROM.	% de CV	Coincidencia con el resultado esperado	CT PROM.	% de CV	Coincidencia con el resultado esperado	CT PROM.	% de CV	Coincidencia con el resultado esperado
DENV-1	Positivo moderado	24.23	5.24	20/20	25.83	2.40	20/20	17.91	3.96	20/20
	Positivo bajo	30.45	3.68	19/20	31.15	1.32	19/20	21.28	3.34	20/20
	Negativo alto	38.75	3.51	16/20	38.70	4.16	15/20	19.41	5.87	16/20
	Negativas	NA	NA	20/20	NA	NA	20/20	38.54*	NA	19/20
DENV-2	Positivo moderado	26.89	5.09	20/20	24.97	2.76	20/20	18.65	5.52	20/20
	Positivo bajo	32.02	3.94	18/20	30.80	3.21	19/20	22.27	4.63	20/20
	Negativo alto	40.24	2.91	14/20	38.08	2.42	17/20	19.72	8.01	15/10
	Negativas	NA	NA	20/20	39.22*	NA	20/20	41.72*	NA	19/20
DENV-3	Positivo moderado	25.53	4.97	20/20	25.25	4.32	20/20	18.51	4.16	20/20
	Positivo bajo	30.62	3.66	20/20	30.88	2.33	20/20	21.56	3.57	20/20
	Negativo alto	38.91	3.16	15/20	38.49	4.65	16/20	21.10	5.73	16/20
	Negativas	NA	NA	20/20	39.71*	NA	20/20	38.63*	NA	19/20
DENV-4	Positivo moderado	24.83	4.27	20/20	25.46	3.61	20/20	17.78	6.13	20/20
	Positivo bajo	30.10	2.82	19/20	30.40	6.09	19/20	21.30	3.62	19/20
	Negativo alto	39.14	3.68	14/20	38.02	3.10	15/20	26.90	8.18	17/20
	Negativas	NA	NA	20/20	NA	NA	20/20	NA	NA	20/20
Control neg.		NA	NA	20/20	NA	NA	20/20	NA	NA	20/20

NA: No aplicable (las muestras no obtuvieron un valor de CT).

*Solo una muestra obtuvo un valor de CT.



Resumen del estudio de reproducibilidad para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC usando el instrumento para RT-PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx de ABI y el programa SSD versión 1.4

		CT PROM.	% de CV	Coincidencia con el resultado esperado	IC de 95%
DENV-1	Positivo moderado	25.52	3.41	60/60 (100%)	94.0 - 100
	Positivo bajo	31.03	2.42	58/60 (96 %)	88.6 - 99.11
	Negativo alto	38.60	3.55	47/60 (21%)	15.9 - 39.6
	Negativas	38.54*	NA	60/60 (100%)	NA
DENV-2	Positivo moderado	26.32	3.91	60/60 (100%)	94.0 - 100
	Positivo bajo	31.77	3.43	57/60 (95 %)	86.3 - 98.29
	Negativo alto	38.91	3.14	46/60 (23%)	14.4 - 35.4
	Negativas	40.32*	NA	60/60 (100%)	NA
DENV-3	Positivo moderado	26.01	5.96	60/60 (100%)	94.0 - 100
	Positivo bajo	31.10	4.57	60/60 (100%)	94.0 - 100
	Negativo alto	39.25	3.59	45/60 (25%)	15.8 - 37.23
	Negativas	39.17*	NA	60/60 (100%)	NA
DENV-4	Positivo moderado	25.47	4.00	60/60 (100%)	94.0 - 100
	Positivo bajo	30.62	3.89	57/60 (95 %)	86.3 - 98.29
	Negativo alto	38.62	4.17	46/60 (23%)	14.4 - 35.4
	Negativas	NA	NA	60/60 (100%)	NA
Control neg.		NA	NA	10/10 (100%)	NA

*El valor CT PROM. se basa en una o dos muestras.

23.3 Sensibilidad analítica

Límite de detección

El límite de detección (Limit of Detection, LoD) del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex) se determinó usando un panel de 5 réplicas de virus diluidos en serie en suero o plasma humano en diluciones 1:10. Los paneles se prepararon a partir preparaciones de virus completo, cultivado y cuantificado (pfu/ml) (cepas DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241). El ARN viral de todas las muestras de réplica se extrajo con el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® en el Qiagen QIAcube. Cada elución de ARN viral se analizó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando el sistema para PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen (n.º de CAT. 11732-088) en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®.

El LoD observado del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex) en el suero y el plasma fue de 1×10^3 pfu/ml y se muestra en la siguiente tabla.



Límite de detección del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex) en suero y plasma

Virus	Conc. de virus (pfu/ml)	Suero				Plasma			
		CT Prom.	EST.	Positivo Total	Tasa de positividad	CT Prom.	EST.	Positivo Total	Tasa de positividad
DENV-1	10 ⁷	21.67	0.29	5/5	100%	22.46	0.32	5/5	100%
	10 ⁶	26.15	0.23	5/5	100%	26.82	0.23	5/5	100%
	10 ⁵	30.90	0.73	5/5	100%	31.47	0.76	5/5	100%
	10 ⁴	34.65	2.14	5/5	100%	35.40	0.89	5/5	100%
	10 ³	36.36	1.73	5/5	100%	35.82	3.20	5/5	100%
	10 ²	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
	10 ¹	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
	10 ⁰	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
DENV-2	10 ⁷	21.65	0.23	5/5	100%	21.12	0.26	5/5	100%
	10 ⁶	24.74	0.31	5/5	100%	24.36	0.28	5/5	100%
	10 ⁵	28.83	0.27	5/5	100%	27.15	0.26	5/5	100%
	10 ⁴	31.75	0.52	5/5	100%	32.39	0.84	5/5	100%
	10 ³	35.78	0.23	5/5	100%	36.56	0.67	5/5	100%
	10 ²	39.67	N/A	0/5	0	39.6	N/A	0/5	0
	10 ¹	41.9	N/A	0/5	0	42.5	N/A	0/5	0
	10 ⁰	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
DENV-3	10 ⁷	20.67	0.25	5/5	100%	22.21	0.38	5/5	100%
	10 ⁶	24.18	0.77	5/5	100%	25.34	0.27	5/5	100%
	10 ⁵	28.48	0.55	5/5	100%	29.39	0.14	5/5	100%
	10 ⁴	32.27	0.73	5/5	100%	32.85	0.18	5/5	100%
	10 ³	36.58	1.32	4/5	80%	35.36	1.03	5/5	100%
	10 ²	39.71	N/A	0/5	0	38.36	0.06	3/5	60%
	10 ¹	42.01	N/A	0/5	0	41.87	N/A	0/5	0
	10 ⁰	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
DENV-4	10 ⁷	22.46	0.13	5/5	100%	24.75	0.18	5/5	100%
	10 ⁶	26.33	0.48	5/5	100%	28.20	0.12	5/5	100%
	10 ⁵	29.64	0.83	5/5	100%	31.29	0.40	5/5	100%
	10 ⁴	32.61	0.49	5/5	100%	34.05	1.33	5/5	100%
	10 ³	36.68	0.46	5/5	100%	36.72	1.18	5/5	100%
	10 ²	39.55	N/A	0/5	0	38.73	2.34	1/5	20%
	10 ¹	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0
	10 ⁰	N/A	N/A	0/5	0	N/A	N/A	0/5	0



El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) también se determinó usando un panel de virus de 5 réplicas diluidos en serie en plasma o suero humano negativos para el dengue, como se describe para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex). El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) en suero y plasma fue similar (1×10^3 pfu/ml) al ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo singleplex) si se utilizaba un método de extracción de ARN manual (minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp®).

LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) con un método automático de extracción de ARN (minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® y Qiagen QIAcube)

El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) se estableció usando un panel de virus de 5 réplicas diluidos en serie en suero o plasma humano en diluciones 1:10. Para el desarrollo de estos paneles, se usaron preparaciones de virus completo, cultivado y cuantificado (pfu/ml) (cepas DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241). El ARN viral de todas las muestras de réplica se extrajo con el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® (n.º de CAT. 61904) en el Qiagen QIAcube (n.º de CAT. 9001292) siguiendo el protocolo del fabricante. Cada elución de ARN viral se analizó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando el sistema para PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen (n.º de CAT. 11732-088) en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®.

El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) en suero y plasma fue similar (1×10^3 pfu/ml) para ambos métodos de extracción de ARN: un sistema automatizado (minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® y Qiagen QIAcube) o un procedimiento manual (minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp®).

LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) utilizando un método de extracción de ARN automatizado (kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC en el instrumento MagNA Pure LC 2.0)

El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) se estableció usando un panel de virus de 5 réplicas diluidos en serie en suero o plasma humano en diluciones 1:10. Para el desarrollo de estos paneles, se utilizaron preparaciones de virus completo, cultivado y cuantificado (pfu/ml) (cepas DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241). El ARN viral de todas las muestras de réplica se extrajo mediante el kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC 2.0 de Roche (03 038 505.001) en el instrumento MagNA Pure LC 2.0 de Roche y siguiendo el protocolo del fabricante. Cada elución de ARN viral se analizó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando el sistema para PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen (n.º de CAT. 11732-088) en el termociclador 7500 FAST DX de Applied Biosystems®.



El LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) en suero y plasma fue similar (1×10^3 pfu/ml) utilizando un método de extracción de ARN automatizado (kit de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC en el instrumento MagNA Pure LC 2.0)

No hubo diferencia en el LoD del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex) con tres métodos de extracción viral: un kit automatizado de aislamiento de ácido nucleico total MagNA Pure LC en el instrumento MagNA Pure LC 2.0, un minikit automatizado de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® y Qiagen QIAcube, o un procedimiento manual (minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp®).

Reactividad analítica

A fin de evaluar si el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC detecta una variedad de cepas actualmente circulantes, el LoD observado del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se confirmó usando cepas de DENV

1 – 4 adicionales. Se cultivaron y cuantificaron veintinueve aislados de DENV 1-4 de pacientes de diferentes países. Las poblaciones cuantificadas se diluyeron en serie en suero humano a diluciones 1:10 hasta 10^3 y 10^2 pfu/ml y se analizaron. Las muestras se analizaron por triplicado de cada dilución mediante el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex). El LoD observado del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC fue similar en aislados cultivados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.



Aislados de DENV analizados con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (modo multiplex)

YEAR	Country	Genotype	10 ³ pfu/ml				10 ² pfu/ml			
			AVG CT	STD	Pos/Total	GCE/ml	AVG CT	STD	Pos/Total	GCE/ml
DENV-1 Strains										
2003	Brazil	African/American	31.99	1.74	3/3	1.89 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2007	Mexico	African/American	34.45	0.47	2/3	9.87 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2007	Venezuela	African/American	32.32	1.08	3/3	1.58 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1994	Sri Lanka	South Pacific	32.88	0.18	3/3	8.99 x 10 ³	NA	NA	0/3	N/A
2004	Philippines	South Pacific	33.29	0.71	3/3	7.23 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2004	Thailand	Asian	36.21	1.42	2/3	2.75 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
DENV-2 Strains										
2003	Brazil	SE Asian/American	32.39	0.32	3/3	8.11 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2007	Colombia	SE Asian/American	31.69	0.34	3/3	7.66 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1980	Ivory Cost	Sylvatic	31.67	0.34	3/3	2.46 x 10 ⁴	36.6	1.37	2/3	7.22 x 10 ³
1988	Vietnam	Asian I	32.18	0.40	3/3	2.17 x 10 ⁴	36.11	NA	1/3	6.89 x 10 ⁴
2006	Thailand	Asian I	32.14	0.87	3/3	9.56 x 10 ³	NA	NA	0/3	N/A
2003	Dominican R.	SE Asian/American	32.78	0.32	3/3	7.24 x 10 ⁴	35.87	NA	1/3	3.44 x 10 ³
2003	Costa Rica	SE Asian/American	32.04	0.14	3/3	3.15 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1996	Peru	American	32.39	0.32	3/3	5.99 x 10 ²	37.12	1.26	1/3	1.88 x 10 ³
1982	Burkina Faso	Cosmopolitan	32.86	1.05	3/3	2.12 x 10 ⁴	37.44	0.86	1/3	7.98 x 10 ³
DENV-3 Strains										
2006	Puerto Rico	Indian Subcont.	32.04	0.42	3/3	6.99 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2003	Brazil	Indian Subcont.	31.99	1.74	3/3	1.39 x 10 ⁴	36.99	1.27	1/3	8.9 x 10 ³
1995	Samoa	South Pacific	36.69	1.47	2/3	5.12 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	NA
2006	Thailand	Thailand	32.16	0.81	3/3	2.10 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2000	Ecuador	Indian Subcont.	32.88	0.18	3/3	1.87 x 10 ⁴	36.41	0.91	1/3	6.34 x 10 ³
1991	Cook Island	South Pacific	33.29	0.71	3/3	2.11 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
DENV-4 Strains										
2006	Colombia	Indonesian	36.60	1.30	2/3	2.23 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
2006	Mexico	Indonesian	32.39	0.32	3/3	9.15 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1992	Sri Lanka	SE Asian	31.70	0.33	3/3	2.44 x 10 ⁴	36.59	0.76	1/3	3.65 x 10 ³
2006	Thailand	SE Asian	35.78	0.40	2/3	1.45 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1994	St. Croix	Indonesian	32.18	0.40	3/3	2.89 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	N/A
1999	Ecuador	Indonesian	32.14	0.87	3/3	5.35 x 10 ⁴	36.56	NA	1/3	7.98 x 10 ³
1995	Micronesia	SE Asian	32.78	0.32	3/3	2.13 x 10 ⁴	NA	NA	0/3	2.77 x 10 ³



23.4 Especificidad analítica

Reactividad cruzada

La especificidad analítica del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se evaluó probando el ensayo con ácidos nucleicos extraídos de 12 organismos que representan patógenos comunes presentes en muestras de sangre, suero o plasma de pacientes con enfermedad febril incluidos en el diagnóstico diferencial de dengue. Estos patógenos se obtuvieron de muestras almacenadas de los CDC. Diez de estos patógenos se utilizaron para adicionar al suero humano (que se confirmó negativo para el virus del dengue) en las concentraciones clínicamente significativas. Estos 10 organismos incluyeron cuatro arbovirus de ARN (virus del Nilo Occidental [West Nile virus, WNV], el virus de la fiebre amarilla [yellow fever virus, YFV], el virus de la encefalitis de San Luis [Saint Louis encephalitis virus, SLEV] y el virus de Chikungunya [Chikungunya virus, CHIKV]), de los cuales el WNV, YFV y SLEV son flavivirus relacionados con el DENV. El virus del herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y -2), el citomegalovirus (CMV) y el virus de la varicela zóster (varicella zoster virus, VZV) son virus de ADN seleccionados para este estudio. Dos organismos bacterianos, la *Leptospira* y *Borellia*, también se adicionaron al suero para los estudios de reactividad cruzada. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se realizó en los 12 triplicados de muestras. Se extrajo el ARN utilizando el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp® y se analizó con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC usando el sistema para RT-PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®. Se obtuvieron resultados negativos con el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC en todas las muestras por triplicado para todos los 12 organismos analizados. No se observó reactividad cruzada con ningún integrante del panel analizado a concentraciones clínicamente significativas.

Patógeno	Tipo de muestra	Concentración	RT-PCR en tiempo real para DENV
			Tasa positiva
Virus		pfu/ml	
WNV	suero adicionado	6.9×10^7	0/3
YFV	suero adicionado	3.7×10^6	0/3
SLEV	suero adicionado	3.7×10^6	0/3
CHIKV	suero adicionado	4.0×10^6	0/3
HCV	suero clínico	Desconocido	0/3
VHA	suero clínico	Desconocido	0/3
HSV-1	suero adicionado	1.0×10^5	0/3
HSV-2	suero adicionado	1.0×10^5	0/3
CMV	suero adicionado	1.0×10^5	0/3
VZV	suero adicionado	1.0×10^5	0/3
Bacterias		bacterias/ml	
<i>Leptospira</i>	suero adicionado	2.5×10^5	0/3
<i>Borrelia burgdorferi</i>	suero adicionado	1.0×10^6	0/3



Interferencia

El rendimiento del ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC se caracterizó en presencia de sustancias potencialmente interferentes que razonablemente se podía esperar que estuvieran presentes en las muestras de suero y plasma. Todos los estudios de interferencia se realizaron en presencia de preparaciones de virus completo, cultivado y cuantificado (pfu/ml) (cepas DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 H241) diluidas a concentraciones 1:10 superiores a la dilución del LoD, iguales a la dilución del LoD, y a una dilución 1:10 por debajo del LoD. Cada dilución viral se analizó tres veces en suero humano normal (normal human serum, NHS) o en NHS con bilirrubina (342 µmol/l), colesterol (13 mmol/l), hemoglobina (2 g/l), triglicéridos (37 mmol/l) y ADN genómico (400 µg/100 ml). Los niveles analizados para cada sustancia endógena se basaron en la norma EP7-A2 (2005) del Instituto de Laboratorios Clínicos (NCCLS).

El ARN viral de cada muestra se extrajo con el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp®. Los ARN virales extraídos se analizaron siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando el sistema para RT-PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®. No se observó ningún tipo de interferencia en la presencia de las sustancias potencialmente interferentes descritas y analizadas a las concentraciones especificadas anteriormente.

23.5 Transferencia/contaminación cruzada

Para evaluar la posible contaminación cruzada de las muestras en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC, se analizaron en una serie alternante 8 conjuntos de réplicas de DENV-1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87, DENV-4 H241. Las preparaciones de virus completo, cultivado y cuantificado (pfu/ml) de DENV-1, -2, -3 y 4 se diluyeron hasta alcanzar concentraciones positivas altas (10^7 pfu/ml) y negativas altas (5×10^2 pfu/ml). Se utilizó el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC para analizar en una serie alternante de 8 réplicas con concentraciones positivas altas y ocho con concentraciones negativas altas. El ARN viral de todas las muestras de réplica se extrajo con el minikit de ARN viral DSP Qiagen QIAamp®. Cada elución de ARN viral se analizó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC y usando el sistema para RT-PCR en tiempo real cuantitativo de un solo paso SuperScript® III Platinum® de Invitrogen en el termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®. Todos los resultados fueron los esperados. Las muestras negativas analizadas resultaron negativas (32/32) y las muestras positivas resultaron positivas (32/32) el 100% de las veces.



24. REFERENCIAS

1. World-Health-Organization. 2009. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*.
2. Rigau-Perez, J. G., A. V. Vorndam, and G. G. Clark. 2001. *The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico, 1994-1995*. *Am J Trop Med Hyg* 64:67-74.
3. Tomashek, K. M., A. Rivera, J. L. Munoz-Jordan, E. Hunsperger, L. Santiago, O. Padro, E. Garcia, and W. Sun. 2009. *Description of a large island-wide outbreak of dengue in Puerto Rico, 2007*. *Am J Trop Med Hyg* 81:467-474.
4. McElroy, K. L., G. A. Santiago, N. J. Lennon, B. W. Birren, M. R. Henn, and J. L. Munoz-Jordan. 2011. *Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986-2007*. *Emerg Infect Dis* 17:64-71.
5. Prince, H. E., J. L. Matud, and J. M. Lieberman. 2011. *Dengue virus immunoglobulin M detection in a reference laboratory setting during the 2010 dengue virus outbreak on Caribbean islands*. *Clin Vaccine Immunol* 18:1104-1107.
6. Mohammed, H., M. Ramos, J. Armstrong, J. Munoz-Jordan, K. O. Arnold-Lewis, A. Ayala, G. G. Clark, E. S. Tull, and M. E. Beatty. 2010. *An outbreak of dengue fever in St. Croix (US Virgin Islands), 2005*. *PLoS ONE* 5:e13729.
7. Centers for Disease, C., and Prevention. 2010. *Travel-associated Dengue surveillance - United States, 2006-2008*. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 59:715-719.
8. Brunkard, J. M., J. L. Robles Lopez, J. Ramirez, E. Cifuentes, S. J. Rothenberg, E. A. Hunsperger, C. G. Moore, R. M. Brussolo, N. A. Villarreal, and B. M. Haddad. 2007. *Dengue Fever Seroprevalence and Risk Factors, Texas-Mexico Border, 2004*. *Emerg Infect Dis* 13:1477-1483.
9. Ramos, M. M., H. Mohammed, E. Zielinski-Gutierrez, M. H. Hayden, J. L. Lopez, M. Fournier, A. R. Trujillo, R. Burton, J. M. Brunkard, L. Anaya-Lopez, A. A. Banicki, P. K. Morales, B. Smith, J. L. Munoz-Jordan, and S. H. Waterman. 2008. *Epidemic Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever at the Texas-Mexico Border: Results of a Household-based Seroepidemiologic Survey, December 2005*. *Am J Trop Med Hyg* 78:364-369.
10. Centers for Disease, C., and Prevention. 2010. *Locally acquired Dengue--Key West, Florida, 2009-2010*. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 59:577-581.
11. Radke, E. G., C. J. Gregory, K. W. Kintziger, E. K. Sauber-Schatz, E. A. Hunsperger, G. R. Gallagher, J. M. Barber, B. J. Biggerstaff, D. R. Stanek, K. M. Tomashek, and C. G. Blackmore. 2012. *Dengue outbreak in Key West, Florida, USA, 2009*. *Emerg Infect Dis* 18:135-137.
12. Effler, P. V., L. Pang, P. Kitsutani, V. Vorndam, M. Nakata, T. Ayers, J. Elm, T. Tom, P. Reiter, J. G. Rigau-Perez, J. M. Hayes, K. Mills, M. Napier, G. G. Clark, and D. J. Gubler. 2005. *Dengue fever, Hawaii, 2001-2002*. *Emerg Infect Dis* 11:742-749.
13. Grobusch, M. P., M. Niedrig, K. Gobels, K. Klipstein-Grobusch, and D. Teichmann. 2006. *Evaluation of the use of RT-PCR for the early diagnosis of dengue fever*. *Clin Microbiol Infect* 12:395-397.
14. Johnson, B. W., B. J. Russell, and R. S. Lanciotti. 2005. *Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay*. *J Clin Microbiol* 43:4977-4983.



15. Lanciotti, R. S. 2003. *Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. Adv Virus Res* 61:67-99.
16. Bessoff, K., E. Phoutrides, M. Delorey, L. N. Acosta, and E. Hunsperger. 2010. *Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool. Clin Vaccine Immunol* 17:949-953.
17. Peeling, R. W., H. Artsob, J. L. Pelegriño, P. Buchy, M. J. Cardoso, S. Devi, D. A. Enria, J. Farrar, D. J. Gubler, M. G. Guzman, S. B. Halstead, E. Hunsperger, S. Kliks, H. S. Margolis, C. M. Nathanson, V. C. Nguyen, N. Rizzo, S. Vazquez, and S. Yoksan. 2010. *Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol* 8:S30-38.
18. Hunsperger, E. A., S. Yoksan, P. Buchy, V. C. Nguyen, S. D. Sekaran, D. A. Enria, J. L. Pelegriño, S. Vazquez, H. Artsob, M. Drebot, D. J. Gubler, S. B. Halstead, M. G. Guzman, H. S. Margolis, C. M. Nathanson, N. R. Rizzo Lic, K. E. Bessoff, S. Kliks, and R. W. Peeling. 2009. *Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. Emerg Infect Dis* 15:436-440.

25. RECURSOS ADICIONALES

1. <http://www.cdc.gov/dengue/>
2. <http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/index.html>
3. <http://www.healthmap.org/dengue/index.php>
4. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>



26. INFORMACIÓN DE CONTACTO, PEDIDOS Y APOYO DEL PRODUCTO

PARA OBTENER ASISTENCIA TÉCNICA Y DEL PRODUCTO, COMUNÍQUESE DIRECTAMENTE CON EL EQUIPO DE APOYO DE LA SUBDIVISIÓN DE DENGUE DE LOS CDC:

Para obtener asistencia técnica

Envíe un correo electrónico a la siguiente dirección: DenguePCRSupport@cdc.gov

Para obtener información sobre los pedidos:

Envíe un correo electrónico a la siguiente dirección: DenguePCROrdering@cdc.gov

Incluya la siguiente información en su mensaje:

- Nombre y dirección del laboratorio
- Persona de contacto calificada
- Número de teléfono
- Dirección de correo electrónico
- Dirección de envío

