

**Sistema General de Regalías
Regalías para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación**

Proyecto 4

“Ensayo clínico aleatorizado multicéntrico de la validez e impacto de pruebas diagnósticas para dengue en sujetos con síndrome febril”

Programa

“AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su impacto en la sociedad”

Investigador principal: LYDA ELENA OSORIO AMAYA ¹

**Coinvestigadores: BEATRIZ PARRA ¹
ANILZA BONELO ¹
DORIS SALGADO ²
CLAUDIA FIGUEROA ³**

¹ Universidad del Valle

² Universidad Surcolombiana

³ Universidad Industrial de Santander

TABLA DE CONTENIDO

1. TÍTULO	2
2. RESUMEN EJECUTIVO.....	3
3. PALABRAS CLAVE.....	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD	5
5. JUSTIFICACIÓN	7
6. OBJETIVOS	7
7. MARCOS DE REFERENCIA.....	8
8. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA 14	
9. METODOLOGÍA:	15
10. DISPOSICIONES VIGENTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS	20
11. PRODUCTOS DEL PROGRAMA:.....	22
12. RESULTADOS DEL PROGRAMA	23
13. IMPACTOS DEL PROGRAMA	25
14. COBERTURA	27
15. CRONOGRAMA	27
16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES.....	28
17. BIBLIOGRAFÍA	28

1. TÍTULO

Proyecto: “Ensayo clínico aleatorizado multicéntrico de la validez e impacto de pruebas diagnósticas para dengue en sujetos con síndrome febril”

Programa: “AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su impacto en la sociedad”

Programa: “AEDES - Abordando Áreas Endémicas de Dengue para la disminución de su impacto en la Sociedad”

Proyecto: “Ensayo clínico aleatorizado multicéntrico de la validez e impacto de pruebas diagnósticas para dengue en sujetos con síndrome febril”

2. RESUMEN EJECUTIVO

El diagnóstico de dengue en los servicios de salud es aún problemático. Ante la falta de disponibilidad de una prueba de laboratorio adecuada, el diagnóstico de dengue es fundamentalmente clínico. Específicamente en Colombia, menos de la mitad de los casos reportados son confirmados por laboratorio lo cual, debido a que los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio en sujetos con dengue son prácticamente indistinguibles de otras enfermedades febriles prevalentes en las mismas áreas geográficas, dificulta la vigilancia de casos, la detección precoz de epidemias, las acciones de control y el enfoque adecuado del paciente.

La detección de la proteína NS1 del virus es una alternativa potencial para el diagnóstico de dengue pero aún no existen lineamientos internacionales ni nacionales para su implementación y aún, si existieran estos lineamientos, los resultados de otros estudios no son necesariamente aplicables a nuestro país por ser un área hiperendémica (circulación de los 4 serotipos) y tener una política de vacunación contra fiebre amarilla (un factor de reacción cruzada en pruebas serológicas para anticuerpos). Las pruebas diagnósticas basadas en la detección NS1 permiten la identificación de casos en los primeros días de síntomas, son rápidas y de bajo costo. Estudios recientes, sugieren que la detección simultánea de NS1 y de anticuerpos específicos tendría una mayor sensibilidad para el diagnóstico de dengue que las pruebas por separado. Nuestros resultados preliminares, al igual que la mayoría de estudios publicados a la fecha, informan el rendimiento de estas pruebas bajo condiciones ideales con muestras preseleccionadas cuyo estatus de dengue era conocido. Estos estudios son prometedores pero son limitados a la hora de hacer inferencias acerca del uso de las pruebas en la práctica clínica de rutina. Según los lineamientos de la medicina basada en evidencia, no basta con que una prueba diagnóstica demuestre ser sensible y específica sino que además es necesario identificar si a los sujetos a quienes se les realiza la prueba diagnóstica les va mejor que a sujetos similares a quienes no se les realiza. Por esta razón, el presente proyecto busca determinar la utilidad clínica, en términos de validez e impacto, que tiene la detección simultánea de NS1 y anticuerpos específicos para dengue en condiciones reales de los servicios de salud.

Se realizará un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico para evaluación de pruebas diagnósticas en el cual se incluirán en forma consecutiva 5000 muestras de suero de sujetos con sospecha clínica de dengue que son atendidos en instituciones de salud de los departamentos que hacen parte del programa (Arauca, Casanare, Meta, Huila, Santander, Norte de Santander y Valle del Cauca). Las muestras clínicas de los sujetos serán aleatorizadas para ser evaluadas con la prueba IgM/IgG solamente o NS1 e IgM/IgG en forma simultánea. En forma paralela se obtendrá información de sujetos con sospecha clínica de dengue en quienes no se solicitó prueba diagnóstica. Las pruebas de

oro (RT-PCR y aislamiento viral) se harán en todas las muestras independientemente de los resultados de las pruebas de estudio y en forma enmascarada para evitar sesgos. La diferencia estadística en la sensibilidad y especificidad entre las pruebas (IgM/IgG y NS1/IgM/IgG) se comparará entre las pruebas con Chi2 para muestras independientes y entre las razones de probabilidad con el método de Roldán y Luna. Se evaluarán las diferencias en el cumplimiento del protocolo nacional de manejo, la solicitud de otras pruebas de laboratorio, la frecuencia de hospitalización y re-consulta, la prescripción de medicamentos, la incidencia de complicaciones y desenlace final (recuperación o muerte) en sujetos con sospecha clínica de dengue que fueron evaluados por las pruebas IgM/IgG o NS1/IgM/IgG o en quienes no se solicitaron pruebas diagnósticas de dengue con la prueba de Chi2 para muestras independientes y se elaborarán curvas de sobrevida para la estancia hospitalaria que se compararán con la prueba de logaritmos del rango (Logrank). En todos los análisis se tendrán en cuenta el tiempo de evolución de síntomas, tipo de infección (primaria y secundaria), serotipo viral y gravedad de la infección como fuentes de heterogeneidad.

Con los resultados del presente estudio se propone contribuir con información crítica para la toma de decisiones con relación a la implementación de pruebas de diagnóstico rápido de dengue en las instituciones de salud. El uso basado en evidencia de estas pruebas tendría impacto en el manejo adecuado y oportuno de los casos de dengue para prevenir complicaciones y disminuir la mortalidad por esta causa. A nivel comunitario permitiría mejorar la vigilancia epidemiológica del dengue y la evaluación de las intervenciones. La difusión de los resultados del estudio se hará tanto a la comunidad científica nacional e internacional como a los tomadores de decisiones y la comunidad a nivel nacional.

EXECUTIVE SUMMARY

Dengue diagnosis in the routine clinical setting remains problematic. Currently, dengue diagnosis is mainly based in clinical criteria as appropriate laboratory diagnostic tests are not available. Specifically in Colombia, less than half of the dengue reported cases are laboratory confirmed which, because the signs, symptoms and laboratory findings in patients with dengue are virtually indistinguishable from other febrile illnesses prevalent in the same geographical areas, complicate case surveillance, early outbreak detection, deployment of control measures and appropriate patient treatment.

Detection of the viral NS1 protein is a potential alternative for the diagnosis of dengue but no international or national guidelines for implementation are provided yet. Moreover, if these guidelines were available, the results of other studies are not necessarily applicable to our country as Colombia is considered to be hyperendemic (circulation of the 4 dengue serotypes) and have a policy of vaccination against yellow fever (a factor of cross-reactivity in serological tests for antibodies). Diagnostic tests based on NS1 detection allow the identification of cases in the first days of symptoms, are quick and inexpensive. Recent studies suggest that the simultaneous detection of NS1 and specific antibodies have a greater sensitivity for the diagnosis of dengue than each test separately. Our preliminary results, and most studies published to date, report the performance of these tests under ideal conditions with pre-selected samples whose dengue status was known. These studies are promising but are limited to make inferences about the use of these tests in the routine clinical practice. According to evidence-based medicine a diagnostic test should be assessed for its sensitivity, specificity, and likelihood ratio but ultimately it is

necessary to identify whether the subjects who undergo the diagnostic test do better than similar subjects in whom the diagnostic test is not performed. For this reason, this project seeks to determine the clinical usefulness, in terms of validity and impact, of the simultaneous detection of NS1 and dengue-specific antibodies under real-life conditions of health services in Colombia.

A multicenter randomized clinical trial for assessment of diagnostic tests will be conducted. A total of 5000 consecutive serum samples from subjects with clinical suspicion of dengue fever that are seen in health institutions in the departments targeted by the program (Arauca, Casanare, Huila, Meta, Norte de Santander, Santander and Valle del Cauca) in Colombia will be included. Clinical samples of subjects will be randomized to be evaluated with the IgM/IgG test alone or NS1 and IgM/IgG simultaneously. Concurrently, information from subjects with clinically suspected dengue in whom no diagnostic test was requested will be obtained. Gold Standard tests (RT-PCR and viral isolation) will be carried out in all samples regardless of the results of the tests by masked experienced technicians to avoid bias. The statistical differences in sensitivity and specificity between tests (IgM/IgG and NS1/IgM/IgG) will be estimated with the Chi² test for independent samples and the likelihood ratios will be compared using the method of Roldan and Luna. The impact of the tests will be evaluated based on the statistical differences in compliance with the national dengue management protocol, the number of other laboratory tests requested, the frequency of hospitalization and re-consultation, prescription drugs, the incidence of complications and final outcome (recovery or death) in subjects who were tested by IgM/IgG or NS1/IgM/IgG or in whom dengue diagnostic tests were not requested. The Chi² test for independent samples will be used for categorical variables and survival curves with the corresponding log rank test (Logrank) will be used to compare hospital stay. In all the analyses the days of fever upon consultation, type of infection (primary and secondary), serotype and severity will be taken into account as sources of heterogeneity.

The results of this study would contribute with critical information to make evidence-based decisions regarding the implementation of rapid diagnostic tests for dengue in health institutions in Colombia. Evidence-based use of these tests would impact on the appropriate and timely treatment of dengue cases to prevent complications and reduce mortality due to this cause. At the community level, proper dengue diagnosis would improve dengue surveillance and evaluation of interventions. The results of the study will be communicated to the scientific community both national and international as well as to decision makers and the general community nationwide.

3. PALABRAS CLAVE

Dengue, Diagnóstico, Ensayo clínico, Evaluación en salud.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores más frecuente en las áreas urbanas de países tropicales y subtropicales. Colombia reporta el mayor número de muertes por esta causa en la región andina y su disminución es una prioridad nacional. El manejo adecuado de los pacientes con dengue y la detección oportuna de las epidemias por esta causa requieren establecer un diagnóstico precoz y adecuado de la infección por el virus dengue. Sin embargo, el diagnóstico de dengue en los servicios de salud es aun problemático.

El aislamiento e identificación viral, la detección de la secuencia genómica del virus por RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa en español) y la detección de anticuerpos IgM específicos en sangre periférica son los tres principales métodos diagnósticos para dengue. El aislamiento e identificación viral se considera la prueba de referencia en el diagnóstico de dengue pero es costosa, se puede demorar entre 6 y 10 días para obtener resultados y solo se realiza en laboratorios especializados que cuentan con cultivos celulares o colonias de mosquitos donde se replica el virus. La RT-PCR es también una prueba costosa y no se encuentra disponible en la mayoría de laboratorios clínicos de los hospitales. Por el contrario, existen en el mercado pruebas basadas en ELISA e inmunocromatografía para la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos que dan resultados en forma rápida como para poder definir el manejo de los pacientes. Sin embargo, la detección de los primeros anticuerpos IgM específicos en una persona infectada tarda usualmente 5 días después del inicio de los síntomas lo que en realidad no se constituye en un diagnóstico precoz de la infección. Más aún, una sola prueba positiva de IgM o IgG para dengue no se considera como diagnóstica sin el resultado de una segunda muestra pareada en la cual se observe seroconversión o un incremento, se sugiere el cuádruple, de los títulos de IgM reportados en la primera prueba.

Recientemente, se han desarrollado pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la infección por dengue basadas en la detección de una proteína no estructural del virus conocida como NS1. La especificidad de las pruebas para detección de NS1 está entre el 86,1% y 100%. En contraste, la sensibilidad reportada varía entre 20% y 98,9%. La disparidad en los reportes de la sensibilidad se podría explicar por diferencias entre los estudios en la proporción de sujetos con infecciones secundarias, en los días en que se toman las muestras o una variación en los serotipos virales. Nuestros resultados confirman que la sensibilidad de las pruebas diagnósticas basadas en la detección de NS1 se reduce significativamente en infecciones secundarias, después de 3 días del inicio de la fiebre, en dengue grave y en los serotipos virales 2 y 4. Sin embargo, encontramos que la adición de anticuerpos específicos del tipo IgM e IgG a la prueba NS1 mejora su sensibilidad en todas estas situaciones sin disminuir significativamente la especificidad. Por lo tanto la detección simultánea de NS1 y anticuerpos específicos sería potencialmente útil para la confirmación diagnóstica de dengue en zonas endémicas y no endémicas.

Con el fin de evaluar la utilidad clínica de las pruebas diagnósticas para dengue bajo condiciones reales de los servicios de salud esperamos responder: 1) ¿existen diferencias en el rendimiento de las pruebas diagnósticas IgM/IgG y NS1/IgM/IgG y 2) ¿existen diferencias en el manejo clínico, hospitalización y desenlace de los individuos que fueron evaluados por las pruebas diagnósticas IgM/IgG y NS1/IgM/IgG, y de estos individuos con aquellos en quienes no se solicitó una prueba diagnóstica? Los resultados del presente estudio serían útiles para que las autoridades nacionales y las entidades de salud puedan

decidir si se requiere una prueba y si es así, qué prueba de laboratorio implementar para el diagnóstico de dengue, para apoyar la vigilancia de casos y mejorar el manejo clínico de los pacientes. Para la comunidad científica se generaría mayor conocimiento del rendimiento de las pruebas que combinan la detección NS1 con anticuerpos en diferentes contextos epidemiológicos y en el futuro se podría explorar la utilidad de estas pruebas diagnósticas en la evaluación de vacunas, la prevención de complicaciones, disminución de la mortalidad por dengue y detección precoz de epidemias.

5. JUSTIFICACIÓN

Ante la falta de disponibilidad de una prueba de laboratorio adecuada, el diagnóstico de dengue es fundamentalmente clínico. Específicamente en Colombia, menos de la mitad de los casos reportados son confirmados por laboratorio lo cual, debido a que los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio en sujetos con dengue son prácticamente indistinguibles de otras enfermedades febriles prevalentes en las mismas áreas geográficas, dificulta la vigilancia de casos, la detección precoz de epidemias, las acciones de control y el enfoque adecuado del paciente.

A pesar de que se cuenta con un sistema de vigilancia del dengue en el que se definen unos criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos para clasificar un caso como probable o confirmado se desconoce la verdadera magnitud del problema de dengue ya que menos del 30% de los casos de dengue no grave y del 25% de dengue grave reportados en Colombia en 2007 fueron confirmados por laboratorio. Durante la epidemia del 2010 se realizaron esfuerzos para mejorar la confirmación diagnóstica siendo exitosa en el 47% de los casos de dengue y el 52% de los casos de dengue grave. A pesar de esto, los casos reportados corresponden, en su mayoría, a casos probables según las definiciones sugeridas por la OMS. A partir de noviembre de 2009, la OMS publicó nuevas guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue en donde se define una nueva clasificación clínica como: Dengue con y sin signos de alarma y Dengue grave. Sin embargo, en la nueva guía no aparecen aún lineamientos con respecto a la utilidad de las pruebas basadas en NS1 sola o en combinación con anticuerpos NS1/IgM/IgG en el diagnóstico de dengue.

A pesar de esto, algunas instituciones de salud están usando pruebas comerciales de NS1 sola, IgM/IgG o NS1/IgM/IgG sin tener la evidencia de su utilidad, lo cual podría estar generando malas interpretaciones, manejos inadecuados y gasto innecesario de los recursos destinados para el sector salud. Se necesita evidencia para tomar decisiones en la implementación de métodos para mejorar la confirmación diagnóstica de los casos de dengue en el país.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la utilidad clínica, en términos de validez e impacto, que tiene la detección simultánea de NS1 y anticuerpos específicos para dengue en condiciones reales de los servicios de salud departamentos priorizados en Colombia.

Objetivos Específicos

- Determinar diferencias en la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad de las pruebas IgM/IgG y NS1/IgM/IgG en sujetos con sospecha clínica de dengue que son atendidos en instituciones de primer, segundo y tercer grado de complejidad en departamentos priorizados en Colombia.
- Establecer si existen diferencias en el cumplimiento del protocolo de manejo, la solicitud de otras pruebas de laboratorio, la frecuencia de hospitalización y re-consulta, estancia hospitalaria, prescripción de medicamentos, incidencia de complicaciones y desenlace final en sujetos con sospecha clínica de dengue que fueron evaluados por las pruebas IgM/IgG o NS1/IgM/IgG o en quienes no se solicitaron pruebas diagnósticas de dengue en instituciones de primer, segundo y tercer grado de complejidad en departamentos priorizados en Colombia.

7. MARCOS DE REFERENCIA

El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos del género *Aedes* y que afecta a poblaciones que viven o visitan áreas tropicales y subtropicales por debajo de los 1800 msnm. Debido al incremento de la incidencia de dengue observada en las últimas tres décadas, la OMS la considera una emergencia de salud pública a nivel mundial. Se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones de dengue, particularmente en el sureste asiático, América y las islas del Pacífico occidental. En América, Colombia junto con Barbados, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guyana Francesa, México, Perú, Puerto Rico y Venezuela, se clasifican como zonas hiperendémicas para dengue debido a la circulación de los 4 serotipos, lo cual aumenta el riesgo de casos graves y potencialmente fatales de la enfermedad. (WHO/TDR 2009).

En Colombia, se observa también una tendencia ascendente en el dengue con un incremento en la incidencia de hasta 3,5 veces entre un año y otro (Figura 1). En febrero del año 2010, el Ministerio de la Protección Social declaró una alerta epidemiológica y una alerta hospitalaria debido a la presencia de un brote con 11.179 casos de dengue, de los cuales 11% eran formas graves y 30 casos habían sido fatales (MPS, circular 009 del 12 de Febrero de 2010). Hacia finales del año ya se habían acumulado un total de 150.941 casos de dengue, de los cuales 6% eran formas graves y 202 eran casos confirmados de muertes por dengue. Los niños menores de 15 años son el grupo etario más afectado por el dengue (50% de los casos) mientras que los departamentos de Antioquia, Arauca, Boyacá, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Quindio, Risaralda, Putumayo, Santander, Tolima y Valle del Cauca reportan la mayoría de casos en el país. (Rojas 2011)

A pesar de que se cuenta con un sistema de vigilancia del dengue en el que se definen unos criterios clínicos, de laboratorio y epidemiológicos para clasificar un caso como probable o confirmado se desconoce la verdadera magnitud del problema de dengue ya que menos del 30% de los casos de dengue no grave y del 25% de dengue grave reportados en Colombia en 2007 fueron confirmados por laboratorio. (Rojas 2008) Durante la epidemia del 2010 se realizaron esfuerzos para mejorar la confirmación diagnóstica siendo exitosa en el 47% de los casos de dengue y el 52% de los casos de dengue grave. (Grupo ETV-INS Boletín 30 de 2010). A pesar de esto, los casos reportados corresponden, en su mayoría, a casos probables según las definiciones sugeridas por la OMS, las cuales han sido cuestionadas por su baja especificidad, la falta

de reproducibilidad entre países y por la exclusión de presentaciones clínicas graves sin predominio hemorrágico. (Deen et al. 2006, Martínez et al. 2005, Rigau-Pérez 1999) A partir de noviembre de 2009, la OMS publicó nuevas guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue en donde se define una nueva clasificación clínica como: Dengue con y sin signos de alarma y Dengue grave. Sin embargo, en la nueva guía no aparecen aún lineamientos con respecto a la utilidad de las pruebas basadas en NS1 sola o en combinación con anticuerpos NS1/IgM/IgG en el diagnóstico de dengue. (WHO/TDR, 2009) De forma similar, en la Guía de Atención Integral del Manejo Clínico del Dengue en Colombia (reglamentada por la Resolución 412 de 2000), no se menciona el uso de las pruebas rápidas pero si se aclara que las pruebas de laboratorio para dengue están incluidas en el Plan Obligatorio de Salud (POS). Específicamente, el ELISA de captura para dengue está incluido en el POS y es obligación de las Aseguradoras garantizar el diagnóstico del 100% de las formas graves del dengue y 10% de los casos del dengue sin signos de gravedad. Se detalla que esta prueba de laboratorio debe realizarse a aquellos pacientes que tienen más de 5 días de síntomas, lo cual deja sin soporte el diagnóstico de los pacientes en los primeros niveles de atención o cuando consultan en forma precoz. En la misma guía se indica que los Laboratorios Departamentales de Salud Pública, tienen como función principal, realizar el control de calidad a un porcentaje de muestras de casos de dengue como apoyo a la vigilancia en salud pública y la remisión de muestras para vigilancia virológica, no el diagnóstico individual de pacientes. De esta manera, el marco legal del diagnóstico de los sujetos con sospecha clínica de dengue tampoco provee lineamientos acerca de las pruebas basadas en NS1 sola o en combinación con anticuerpos NS1/IgM/IgG. La razón fundamental es porque se requiere la evidencia que permita tomar decisiones y actualizar los lineamientos tanto internacionales como nacionales.

El espectro de presentación clínica del dengue varía desde infecciones asintomáticas hasta casos fatales. La enfermedad inicia con fiebre y síntomas inespecíficos que duran entre 2 y 7 días. Posteriormente, puede progresar a formas más graves con manifestaciones de predominio hemorrágico, compromiso visceral y choque. A pesar de que existen guías de la OMS y la guía nacional de atención para que los médicos reconozcan un caso como dengue, estos pueden ser fácilmente mal diagnosticados (sub o sobre diagnosticados) ya que las manifestaciones clínicas se pueden confundir fácilmente con otras infecciones prevalentes en las mismas áreas geográficas tales como influenza, leptospirosis, malaria, fiebre tifoidea, enterococcus y fiebres virales hemorrágicas, entre otras. (WHO/TDR 2009, INS 2010) En este contexto, las pruebas de laboratorio se constituyen en una ayuda diagnóstica valiosa para confirmar o descartar los casos sospechosos de dengue. A nivel individual la confirmación por laboratorio de los casos con sospecha de dengue es necesaria para tomar decisiones con relación al manejo y seguimiento de los pacientes, mientras que a nivel comunitario se requiere para orientar las acciones de control y detectar precozmente epidemias.

Actualmente, existen 3 métodos principales de laboratorio para el diagnóstico de la infección aguda por dengue: el aislamiento viral, la detección del virus por técnicas de biología molecular y la identificación de anticuerpos específicos del tipo IgM. El aislamiento viral se puede realizar por inoculación directa en mosquitos, en ratones, células de mamífero o, más frecuentemente, por la inoculación de una muestra de suero diluida del paciente en una monocapa de células en cultivo derivadas de mosquito. Después de 1 semana de incubación a 28°C se detecta la presencia del virus por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada uno de los 4 serotipos virales

o de su efecto citopático. El aislamiento viral se considera el método estándar pero su uso clínico es limitado no solo por el costo, la necesidad de una infraestructura de laboratorio sofisticada sino porque los resultados están disponibles después de varios días (entre 6 y 10 días). (WHO/TDR 2009) La detección del virus por técnicas de biología molecular tiene la ventaja de ser más rápida que el aislamiento viral. La técnica más utilizada es el RT-PCR (Retrotranscriptase-Polymerase Chain Reaction) anidada para la cual se pueden usar diferentes grupos de cebadores o primers. (Lanciotti et al. 1992) Sin embargo, la infraestructura para realizar pruebas de biología molecular no está disponible en la mayoría de los hospitales y su uso ha sido principalmente para investigación.

Con el fin de realizar el diagnóstico de dengue directamente en los laboratorios clínicos de las entidades de salud se han desarrollado y comercializado pruebas de laboratorio basadas en la detección de anticuerpos específicos contra dengue por medio de ELISA e inmunocromatografía. Estas pruebas son relativamente sencillas de realizar, los resultados se obtienen en minutos y tienen la ventaja adicional de que permiten diferenciar entre infecciones primarias y secundarias. Una infección primaria se considera en una persona en quien se detectan primero anticuerpos del tipo IgM pero no del tipo IgG mientras que en una infección secundaria se encuentran positivas tanto la IgM como la IgG específicas contra el virus dengue. La desventaja de esta prueba radica en que la detección de los primeros anticuerpos IgM específicos en una persona infectada tarda usualmente entre 4 y 5 días después del inicio de los síntomas lo que en realidad no se constituye en un diagnóstico precoz de la infección. Adicionalmente, los títulos IgM continúan presentes dos o tres meses después de la infección y por lo tanto la positividad a la prueba podría indicar una infección anterior. Por esta razón, se recomienda la realización de pruebas pareadas en la cual se considera un caso de dengue cuando se identifique la conversión de serología negativa a positiva o el incremento, usualmente el cuádruple, en los títulos de anticuerpos. (WHO/TDR 2009) El estándar de oro en el diagnóstico de dengue es usualmente una combinación de al menos 2 de estos 3 métodos. (WHO/TDR 2009, de Oliveira Poersch et al. 2005)

Recientemente, se han desarrollado pruebas de laboratorio que permiten el diagnóstico de dengue en los primeros días de síntomas. Estas técnicas están basadas en la detección de una glicoproteína viral antigénica denominada NS1 (non-structural protein). Esta proteína aparece en la circulación de los sujetos infectados a partir del inicio de síntomas y usualmente disminuye a niveles no detectables en el día 5 o 6 (Alcon et al. 2002). Debido a que NS1 aparece antes de la IgM, estas pruebas se constituyen en una herramienta de diagnóstico precoz de casos con sospecha de dengue que consultan a las entidades de salud.

Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente pruebas basadas en la detección de la proteína NS1 en formato ELISA (Platelia™ de Biorad, Pan E™ de PanBio y SD Standard Diagnostics) y en formato inmunocromatografía (AG Strip™ de Biorad y SD Bioline™ de Standard Diagnostics). La sensibilidad reportada de las pruebas basadas en ELISA varía entre el 20% y el 93,4% mientras que la de la prueba inmunocromatográfica va del 61,6% a 98,9% según los diferentes estudios. De otro lado, la especificidad de todas las pruebas está entre el 86,1% y 100%. (Tabla 1)

La variabilidad en la sensibilidad puede ser atribuida a diferencias de los estudios en la prevalencia de infecciones secundarias y en los días de inicio de la enfermedad en la cual se tomaron las muestras, ya que se ha observado que la sensibilidad de la detección de

NS1 se disminuye en infecciones secundarias comparada con infecciones primarias y con el tiempo de inicio de síntomas. (Hang et al. 2009, Lapphra et al. 2008, Chuansumrit et al. 2008). En teoría, también podría ser explicada por una variación en los serotipos virales circulantes puesto que algunos estudios reportan una menor sensibilidad de la prueba en los serotipos virales DENV2 y DENV4 (Osorio et al. 2010, Ramírez et al. 2009). En América han sido publicados, al momento de la revisión, 1 estudio en Colombia (Osorio et al. 2010), 2 estudios en Brasil, (Lima et al. 2010, Castro-Jorge et al. 2010) 1 en Venezuela, (Ramírez et al. 2009) 2 en la Guyana Francesa (Dussart et al. 2006 y 2008) y un estudio multicéntrico que incluyó a Venezuela y Nicaragua, (Guzman et al. 2010) los cuales reportaron una sensibilidad de entre 34% y 95,9% y una especificidad de entre 81,1% y 100% para la prueba NS1.

De las pruebas disponibles, aquella basada en inmunocromatografía tiene la ventaja de ser más rápida al obtenerse resultados entre 15 y 30 minutos comparada con alrededor de 1 hora de las pruebas basadas en ELISA. Adicionalmente, el costo de la prueba por inmunocromatografía es menor que la ELISA (\$18.000 vs \$50.000 aproximadamente) lo que representaría un ahorro para los servicios de salud al momento de implementarla. Sin embargo, antes de realizar estudios de costo-efectividad de las pruebas basadas en la detección de NS1 para el diagnóstico de dengue se debe corroborar en estudios en Colombia la sensibilidad y especificidad de estas pruebas comerciales e identificar cuál de ellas sería la más adecuada para ser implementada por los servicios de salud. Una prueba diagnóstica para dengue sensible, específica, rápida, fácil de usar y al menor costo que detecte precozmente los casos sería útil para guiar el manejo clínico de los pacientes y potencialmente disminuir las complicaciones, hospitalización y mortalidad por causa del dengue.

Antecedentes y resultados preliminares del presente estudio:

Nosotros comparamos el rendimiento y reproducibilidad de las pruebas diagnósticas para dengue basadas en la detección de NS1 sola y NS1/IgM/IgG que se encuentran disponibles comercialmente a la fecha y exploramos factores que afectarían su sensibilidad. Realizamos un análisis pareado de 310 muestras almacenadas de sujetos febriles que habían participado en estudios realizados en las ciudades de Cali y Bucaramanga y que fueron caracterizados como positivos (n=218) y negativos (n=92) según aislamiento viral y/o RTPCR y/o seroconversión de IgM. Dos observadores evaluaron en forma enmascarada las muestras con las pruebas Platelia™ Dengue NS1 Ag, Pan-E™ Dengue Early ELISA segunda generación, SD Dengue NS1 Ag ELISA, Dengue NS1 Ag STRIP™, y SD BIOLINE™ Dengue Duo (NS1/IgM/IgG). Esta última prueba había sido lanzada recientemente al mercado por la compañía Standard Diagnostics para la detección simultánea de NS1 y los anticuerpos específicos IgM e IgG mediante inmunocromatografía. Ya algunos autores habían sugerido que la adición de los anticuerpos a las pruebas de NS1 podría mejorar el diagnóstico de dengue (Arya 2010) por lo cual la incluimos en la evaluación.

En efecto, los resultados revelaron que la prueba SD BIOLINE™ Dengue Duo NS1/IgM/IgG tuvo la mayor sensibilidad (80,7% 95%CI 75-85.7) y una especificidad del 89,1% (95%CI 81-94,7) con razones de probabilidad (LR) de 7,4 (95%CI 4.1-13.8) y 0,21 (95%CI 0.16-0.28). Mientras que las pruebas de detección de NS1 en formato ELISA tuvieron sensibilidades por debajo del 75% y aquellas en formato de inmunocromatografía sensibilidad aún menor (por debajo del 65%). También se observó que la sensibilidad de

las pruebas NS1 era menor en infecciones secundarias que en infecciones primarias, en muestras tomadas después del día 3 de inicio de fiebre que en muestras anteriores a ese día, en infecciones graves que en no graves y en los serotipos virales 2 y 4 que en los 1 y 3. La adición de los anticuerpos IgM solamente o ambos IgM e IgG mejoró la sensibilidad de las pruebas en todas estas situaciones sin afectar significativamente la especificidad (Figura 2).

Por lo tanto concluimos que la detección simultánea de NS1/IgM o NS1/IgM/IgG sería potencialmente útil para el diagnóstico de dengue en áreas endémicas en Colombia. Si bien estos resultados son prometedores, este tipo de estudios son realizados en muestras seleccionadas cuyos resultados son conocidos y por lo tanto no son necesariamente extrapolables a la práctica clínica de rutina. De acuerdo con los planteamientos de la medicina basada en evidencia, el siguiente paso es evaluar si la prueba diagnóstica distingue sujetos con o sin dengue entre quienes es razonable sospechar el diagnóstico bajo condiciones reales de la atención médica y si su implementación genera cambios en la conducta por parte del clínico quien sería el usuario directo de la prueba. (Sackett y Haynes, 2002)

Uso de pruebas diagnósticas basado en evidencias:

La Medicina Basada en la Evidencia (MBE) ha sido definida como “el uso concienzudo, explícito y juicioso de la mejor evidencia actualmente disponible para la toma de decisiones acerca del cuidado de los pacientes”. (Evidence-Based Medicine Working Group, 1992). Con relación al uso de tecnologías diagnósticas en el cuidado del paciente, la MBE presenta una serie de interrogantes que deben ser respondidos para proveer la información necesaria para la toma de decisiones. Estos interrogantes incluyen en orden: 1) ¿Los resultados de la prueba diagnóstica difieren entre los individuos afectados y normales?, 2) ¿Los pacientes con ciertos resultados de la prueba diagnóstica tienen una mayor probabilidad de tener la condición de interés?, 3) ¿Los resultados de la prueba diagnóstica tienen la capacidad de distinguir los sujetos con y sin la condición de interés entre quienes es clínicamente posible sospechar tal condición? y 4) ¿A los sujetos a quienes se les realiza la prueba diagnóstica les va mejor que a sujetos similares a quienes no se les realiza? (Sackett y Haynes, 2002)

En dengue existe evidencia disponible acerca de que las pruebas diagnósticas NS1 y anticuerpos específicos difieren entre individuos con y sin dengue (interrogante 1) y que un resultado positivo significa una mayor probabilidad de un diagnóstico de dengue (interrogante 2) (Tabla 1)(Blacksell et al. 2006, 2008, 2012) Así mismo, se conoce que el tiempo de evolución de la fiebre al momento de la toma de la muestra y el tipo de infección (primaria o secundaria) influyen en la presencia de resultados falsos negativos. Los anticuerpos del tipo IgM se detectan solo en la mitad de los sujetos con dengue cuando la muestra se toma entre el día 3 y 5 de inicio de la fiebre, en un 80% al día 5 y en un 99% al día 10. El pico más alto se alcanza a las 2 semanas, a partir de allí disminuye hasta niveles indetectables en 2 a 3 meses. Los anticuerpos del tipo IgG aumentan a partir del final de la primera semana de síntomas y permanecen positivos por varios meses y ocasionalmente de por vida. (WHO/TDR, 2009) Por su parte, las concentraciones de NS1 disminuyen a medida que avanzan los días de síntomas siendo su mayor sensibilidad en los primeros 3 días. (Guzman, 2010) En infecciones secundarias se observa un incremento temprano de IgG en altas concentraciones y no detección de IgM hasta en un 30% de los casos. (Chanama et al. 2004) Mientras que en estas situaciones la sensibilidad de NS1 disminuye hasta en un 27% con relación a las infecciones

primarias. (Kumarasamy et al. 2007) De otro lado, durante estos estudios iniciales se ha identificado que mientras los falsos positivos son relativamente altos en pruebas basadas en IgM, en las pruebas basadas en NS1 son infrecuentes. Wichmann y cols (2006) reportaron hasta 42,5% de resultados falsos positivos con la detección de IgM en una sola muestra de suero en viajeros. Los falsos positivos siendo atribuidos a reactividad cruzada con IgM de otros flavivirus, otras infecciones inespecíficas y el factor reumatoideo. Phuong y cols. (2009) reportaron solo 2/405 falsos positivos con NS1, los cuales no fueron explicados por otras infecciones febriles como influenza A y B, parainfluenza, adenovirus, virus sincitial respiratorio, citomegalovirus/virus de Epstein-Barr y leptospirosis. En cambio, falsos positivos de NS1 podrían ser atribuidos a infecciones por otros flavivirus que también secretan NS1 como el virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis japonesa. (Alcon-Le Poder et al. 2006)

En Colombia, se ha demostrado la alta reactividad cruzada de las pruebas basadas en la detección de IgM anti-dengue en suero de sujetos con fiebre amarilla. (Houghton-Triviño et al. 2008) Sin embargo, en un estudio que se aproxima a la respuesta que se deriva del interrogante 3, se reporta una sensibilidad del 60% de una sola muestra de IgM tomada al día 3 o posterior al inicio de la fiebre con razones de probabilidad de 0,3 y 0,5. (Martínez et al. 2009) Estos resultados sugieren que la implementación de IgM en una sola muestra como prueba diagnóstica de dengue en la práctica clínica de rutina generaría solo pequeños cambios, aunque algunas veces importantes, en la sospecha diagnóstica pretest. (Guyatt et al. 2008) A pesar de estos datos, en vista de las dificultades logísticas y costos que implicaría la toma de muestras pareadas de rutina, algunas instituciones han implementado pruebas de diagnóstico de dengue basadas en la detección de IgM/IgG en una sola muestra y en la guía de la OMS se sugiere que una sola prueba positiva de IgM o de IgG es altamente sugestiva de dengue. (WHO/TDR 2009) Una respuesta a las limitaciones que tiene el uso de IgM en una sola muestra o NS1 sola sería la detección simultánea de NS1 y anticuerpos. Recientemente, se publicaron los resultados del estudio multicéntrico DENCO con relación a la utilidad de NS1 en sujetos mayores de 6 meses de edad con sospecha clínica de dengue y quienes consultaron a instituciones de salud en 6 países de 2 continentes. (Guzman et al. 2010) Es decir este estudio también se aproxima a la respuesta del interrogante 3 de la MBE descrito arriba. Los resultados no son concluyentes con relación al uso o no de estas pruebas en la práctica clínica sino que demuestran una amplísima variación de la sensibilidad de NS1 entre países siendo la más baja 34% en Nicaragua y la más alta 76% en Tailandia para la prueba Platelia™. En el otro país latinoamericano incluido (Venezuela) la sensibilidad fue del 60%. Entonces, estos resultados indican que prácticamente cada país deberá realizar su propia evaluación de la utilidad de NS1 en el diagnóstico de dengue. Sin embargo, estos resultados no apoyarían la realización de estudios posteriores con evaluación de NS1 sola y así, como el mismo estudio lo propone, sería más útil evaluar la combinación de NS1 y anticuerpos. Uno de los países participantes en el estudio DENCO (Vietnam) publicó un análisis más detallado de la combinación de NS1 y anticuerpos con el uso de la prueba SD Dengue Duo. (Tricou et al. 2010) Este estudio mostró que la sensibilidad mejora significativamente del 62,4% con NS1 sola a 75,5% cuando NS1 o IgM fueron positivas y a 83,7% cuando alguna de NS1, IgM o IgG fueron positivas. Estos hallazgos en Vietnam, junto con nuestros resultados preliminares, nos sugieren que la combinación de pruebas NS1 e IgM/IgG sería promisoría para el diagnóstico de dengue en Colombia pero aun no existe evidencia que permita tomar decisiones de su implementación en la práctica clínica de rutina. Justamente, este estudio se propone contribuir con información crítica para la toma de decisiones enfocándose en dar respuesta a este interrogante.

Una consideración importante en la evaluación de pruebas diagnósticas es la medida de resultado que se va a utilizar. Existen numerosas medidas de resultado para evaluar el rendimiento de una prueba de diagnóstico dentro de las cuales las más utilizadas son la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad. (Knottnerus et al. 2008) La sensibilidad se define como la capacidad de la prueba para detectar los verdaderos positivos, es decir que se ve disminuida por la presencia de falsos negativos en la prueba. La especificidad indica la capacidad de la prueba para detectar los verdaderos negativos y se disminuye por la presencia de falsos positivos. Los valores predictivos son medidas que indican la probabilidad de ser clasificado como positivo o negativo para la enfermedad dada la sensibilidad y especificidad de la prueba y la prevalencia de la enfermedad en cuestión. Esto quiere decir que los valores predictivos de las pruebas varían directamente con la prevalencia de la enfermedad. Las razones de probabilidad tienen la ventaja de no depender de la prevalencia de la enfermedad. Las razones de probabilidad indican cuantas veces más (o menos) es la probabilidad de que un sujeto con la enfermedad tenga un resultado en particular de la prueba que sujetos sin la enfermedad. Una razón de probabilidad mayor que 1 muestra que el resultado de la prueba diagnóstica está asociado con la presencia de la enfermedad mientras que un valor menor que 1 señala que el resultado de la prueba se asocia con la ausencia de la enfermedad. Entre más lejano del 1 se encuentre la razón de probabilidad de una prueba diagnóstica más fuerte es la evidencia para la presencia o ausencia de la enfermedad. Valores por encima de 10 y por debajo de 0,1 se consideran evidencia suficiente para confirmar o descartar un diagnóstico en la mayoría de situaciones. (Deeks y Altman 2004)

Para cualquier diagnóstico clínico existe un umbral de probabilidad por debajo del cual el clínico descartaría su presencia y no solicitaría una prueba diagnóstica. Así mismo, por encima de cierto nivel de certeza clínica el médico consideraría el diagnóstico prácticamente confirmado y no solicitaría la prueba diagnóstica. Así que el criterio de utilidad de una prueba diagnóstica para el clínico radica en si el resultado de ella afectaría su conducta o no. Por lo tanto, este estudio al evaluar tanto el rendimiento como el efecto sobre la conducta médica de las pruebas IgM/IgG y NS1/IgM/IgG en la rutina de los servicios de salud espera contribuir con evidencia que oriente la toma de decisiones en la implementación de pruebas diagnósticas para dengue en el país.

8. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA

El presente proyecto pretende contribuir con la salud de la totalidad de la población colombiana que se encuentra a riesgo de dengue y quienes se beneficiarían del uso adecuado de pruebas diagnósticas de dengue. Esta población puede corresponder a los habitantes de áreas en donde existe transmisión de dengue, en quienes viven en zonas que tienen las condiciones para la transmisión de dengue y también a aquellas personas que no viven en zonas endémicas o a riesgo pero si viajan a zonas donde existe transmisión de dengue. Es entonces imposible dar una cifra aproximada de la población a beneficiar con el presente estudio y por lo tanto consideramos que toda la población de nacionales y visitantes de otros países se beneficiaría potencialmente de los resultados del presente estudio.

Para que los resultados tengan validez externa, es decir se puedan generalizar a la población colombiana que consulta a las entidades de salud con síntomas sugestivos de dengue, se propone un estudio multicéntrico en el cual estarán representadas zonas endémicas y no endémicas de dengue en Colombia. En el desarrollo del estudio se propone entonces la evaluación de las pruebas diagnósticas en sujetos que consultan a entidades de salud en todos los niveles de atención en los municipios Barrancabermeja, Bucaramanga, Cali, Yopal, Villavicencio y Cúcuta.

9. METODOLOGÍA:

Diseño del estudio:

Se realizará un ensayo clínico aleatorizado para evaluación de pruebas diagnósticas en población en la que la prueba estaría indicada (sujetos a quienes en la rutina de los servicios de salud se les realizaría una prueba diagnóstica de dengue). En el estudio se incluirán todos los sujetos a quienes se les solicita una prueba diagnóstica para dengue y son las muestras de sangre las que se aleatorizan para ser procesadas por una de las dos pruebas de estudio. Todas las muestras serán evaluadas con el estándar de oro de forma independiente, pareada y en forma enmascarada. Como estándar de oro se utilizará un flujograma diagnóstico que combina RT-PCR, aislamiento viral, e inhibición de la hemaglutinación (IHA). (Figura 3)

Población de estudio:

La población de estudio está constituida por sujetos con síndrome febril y sospecha de dengue que consultan a entidades de salud de diferentes grados de complejidad en áreas representativas de Colombia. Los sujetos representan el espectro clínico del dengue (dengue con y sin signos de alarma y dengue grave) podrían tener infección primaria o secundaria y con circulación de los 4 serotipos virales (zona hiperendémica).

Criterios de inclusión y exclusión:

Se incluirán en el estudio muestras de suero tomadas a hombres y mujeres de cualquier edad y condición clínica que tengan impresión diagnóstica, por médico tratante, de dengue sea como diagnóstico principal o diagnóstico diferencial. Con el fin de controlar por el potencial sesgo de incorporación se excluirán del estudio muestras de sujetos a quienes se les haya realizado, para el cuadro clínico actual, una prueba diagnóstica para dengue y ésta haya sido positiva. Se excluirán muestras de sujetos cuya historia clínica no está disponible en las instituciones de salud participantes. El embarazo ni la procedencia serán criterios de exclusión.

Selección y cálculo del tamaño de la muestra:

Para el estudio se seleccionarán en forma consecutiva 5000 muestras de suero (2500 por grupo). El tamaño de la muestra se obtuvo en el programa Epidat 3.1 (OPS, 2006) con base en 70% de sensibilidad y 80% de especificidad para la prueba NS1/IgM/IgG y de 60% de sensibilidad y 90% de especificidad para la prueba IgM/IgG, con prevalencia esperada de dengue del 10%, 5% de pérdidas, 5% de error tipo I y un poder estadístico del 90%. Para evaluar diferencias estadísticas en el impacto clínico de las pruebas se requieren tamaños de muestra menores, que oscilan entre 235 personas para adherencia al protocolo (40% vs 55% con poder del 90%) y 4030 (2015 por grupo de prueba) personas para incidencia de complicaciones (3% vs 5% con poder del 90%).

Procedimientos:

La muestra recibida en el laboratorio clínico de las IPSs con solicitud de prueba para dengue se aleatorizará para ser procesada por IgM/IgG o por NS1/IgM/IgG en el tiempo que establezca la rutina del laboratorio clínico correspondiente. El resto del suero se almacena refrigerado hasta su envío, también refrigerado, al laboratorio de virología de la Universidad del Valle donde investigadores del grupo VIREM alicuotan las muestras y almacenan a -70oC hasta su análisis por las pruebas de oro.

Los resultados de la prueba de dengue se entregan al médico, se consignan en la base de datos de la historia clínica según corresponda con el procedimiento estandarizado en cada institución. Con el de orientar al médico en el uso de la prueba se sugerirá la siguiente interpretación para la prueba IgM/IgG: IgM(+)/IgG(-)=probable dengue, IgM(-)/IgG(+)=probable dengue o exposición anterior a dengue correlacione con la clínica, IgM(+)/IgG(+)=probable dengue e IgM(-)/IgG(-)=no descarta dengue correlacione con la clínica. Se sugerirá la siguiente interpretación para la prueba NS1/IgM/IgG: NS1(+)= diagnóstico confirmado de dengue, NS1(-)/IgM(+)/IgG(+)= probable dengue, NS1(-)/IgM(+)/IgG(-)= probable dengue, NS1(-)/IgM(-)/IgG(+)=probable dengue o exposición anterior a dengue correlacione con la clínica y NS1(-)/IgM(-)/IgG(-)= no descarta dengue correlacione con la clínica. Esta interpretación se propone con base en los resultados preliminares presentados en el estado del arte.

A las muestras tomadas se les realizará, aleatoriamente, una de las dos pruebas: IgM/IgG SD Bioline™ o la prueba SD Bioline™ Dengue Duo NS1/IgM/IgG siguiendo las especificaciones del fabricante, que se describen brevemente en la siguiente sección. RT-PCR en tiempo real, aislamiento viral, e IHA serán realizadas por personal entrenado del grupo VIREM quien estará enmascarado con relación al resultado de las pruebas de dengue de estudio e información de la historia clínica. No se planean realizar pruebas de laboratorio adicionales para buscar la etiología de los diagnósticos no-dengue debido a que esto aumentaría los costos del estudio y los kits diagnósticos disponibles podrían no dar cuenta de la totalidad o aún la mayoría de los eventos febriles en los sujetos de estudio. Sin embargo, se revisará la historia clínica para verificar si fue posible establecer el diagnóstico definitivo en los casos de no-dengue.

El procedimiento de aleatorización se realizará con la generación de una secuencia de 5000 registros en los cuales se listan las dos pruebas de estudio. El orden en cual aparecen las pruebas de estudio se generará en Stata 10 en una secuencia de bloques permutados de tamaños diferentes. La secuencia será generada por uno de los investigadores quien no estará involucrado en el procesamiento de las muestras. El listado permanecerá en el laboratorio en sobres sellados opacos. Antes de realizar el procesamiento de la muestra, la bacterióloga abre el sobre en su orden consecutivo y revela la prueba que le corresponde utilizar. El resultado de la prueba correspondiente se registra en la base de datos del laboratorio de donde se obtendrá para el análisis de los datos.

Las pruebas de laboratorio para dengue que se van a realizar se describen a continuación:

- a) Prueba SD Bioline™ IgM/IgG: La prueba rápida es un ensayo inmunocromatográfico de fase sólida para la detección cualitativa y diferencial de anticuerpos IgM e IgG contra el virus dengue en suero y plasma. La superficie de la tira lleva tres líneas precubiertas con el correspondiente anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM humano, anti-IgG humano y

un control (anti-dengue IgG de conejo). La muestra (5µL) se deposita en la ventana inferior de la prueba y emigra por capilaridad. El anticuerpo anti-dengue del tipo IgG o IgM es captado por el anti-anticuerpo humano respectivo inmovilizado en dos líneas a lo largo de la tira y genera una línea de color cuya lectura se realiza a los 15-20 min. La línea de control es empleada como control del procedimiento y debe aparecer siempre si el procedimiento se realizó en forma adecuada y los reactivos están funcionando. Esto confirma que el volumen de muestra es suficiente y la técnica del procedimiento es correcta. Si la línea de control no se hace visible se considera como no válido y se repite la prueba con un nuevo dispositivo.

b) Prueba SD Bioline™ Dengue Duo: La prueba está basada en inmunocromatografía de flujo lateral que se presenta en forma de 2 cassettes unidos: uno para NS1 y otro para IgM e IgG. Se adiciona una muestra de sangre, suero o plasma a los pozos de NS1 (75µL) y de los anticuerpos (10µL) la cual migra por capilaridad a lo largo del cassette. El cassette de anticuerpos tiene un pozo adicional para el diluyente. Los anticuerpos IgM e IgG específicos para dengue de la muestra reaccionan con conjugados de oro coloidal de proteínas recombinantes de la membrana del virus dengue que se encuentran en el cassette para formar complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos son capturados por los anticuerpos anti IgG e IgM humanos correspondientes que están inmovilizados en la parte superior del cassette generando una línea de color. Así mismo, el antígeno NS1 de la muestra es capturado por un conjugado de oro coloidal de anti-NS1 del virus dengue y que al migrar reacciona con otro anti-NS1 fijado en la parte superior del cassette generando una línea de color. Después de adicionar la muestra los resultados son visualizados a los 15-20 min.

c) RT-PCR: se realizará en todas las muestras de estudio con el fin de confirmar o descartar dengue y en caso de dengue identificar el serotipo viral. Brevemente, la prueba consiste en la amplificación del ADN copia (cDNA) del genoma del virus dengue presente en muestras de suero o plasma. El RNA viral es extraído con el reactivo de trizol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y el cDNA preparado por transcripción reversa del RNA empleando la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega, Madison, WI) y un cebador antisentido. La amplificación del cDNA se realiza mediante PCR anidado que emplea cebadores específicos que amplifican un fragmento complementario a una región conservada del RNA de los cuatro serotipos del virus dengue, durante el primer ciclo y cebadores específicos para cada uno de los serotipos de virus dengue en el segundo ciclo. (Lanciotti et al. 1992)

d) Aislamiento viral: Se intentará el aislamiento del virus en la línea celular de mosquito (*Ae. albopictus*) C6/36 HT (CDC, San Juan, Puerto Rico). Para ello muestras de suero, obtenidas en la primera semana de síntomas, se inocularán en monocapas celulares y se mantendrán a 33°C durante 10 a 14 días. La multiplicación viral en los cultivos celulares será detectada mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos monoclonales 15F3 (DEN-1), 3H5 (DEN-2), 5D4 (DEN-3) Y 1H10 (DEN-4), todos comprados a Chemicon International, Inc. (Temecula, Calif).

e) Inhibición de la hemaglutinación (IHA): Se realizará en las todas las muestras confirmadas de dengue con el fin de clasificarlas como infección primaria o secundaria. Se utilizará un suero obtenido en la fase convaleciente de la infección (entre el día 15-20 después de inicio de síntomas). También se utilizara IHA para intentar la confirmación diagnóstica de los casos de infección secundaria en los que solamente se tenga una

muestra de suero de fase aguda y el aislamiento del virus fuese negativo (Fig 3). Se anticipa que se realizará en 250 muestras. Brevemente, la prueba consiste en la detección del título de anticuerpos totales específicos a dengue que son capaces de bloquear o inhibir la hemoaglutinación de glóbulos rojos de ciertas especies animales inducida por antígenos del virus dengue. Títulos de anticuerpos inhibidores de hemoaglutinación iguales o superiores a 1:2560 en una muestra de suero de fase aguda o en la muestra de fase convaleciente de un sujeto con dengue son indicativos de una infección secundaria por el virus. Este protocolo ha sido estandarizado y recomendado por la OMS como la prueba de oro para diagnóstico serológico. (Kuno et al. 1991)

Manejo y control de calidad de datos:

La información del formato de recolección de datos y los resultados de las pruebas realizadas serán almacenados en una base de datos en Epiinfo 6.04d (CDC/WHO) utilizando un sistema de control para minimizar errores en el ingreso. Se realizará doble entrada de datos para control de calidad de la digitación de la información. Además del código de la muestra, los resultados de la prueba en estudio y estándar de oro se ingresará información de variables demográficas, clínicas y de laboratorio tales como IPS de origen de la muestra, edad, día de toma de la muestra después del inicio de la fiebre, clasificación clínica del dengue (con o sin signos de alarma y dengue grave), si es dengue grave: cuál es la complicación, hemograma y otras pruebas, si están disponibles, que den cuenta del diagnóstico final del sujeto. Antes del ingreso de la información en la base de datos, un asistente de investigación realizará control de calidad de los formatos de recolección de datos para verificar que estén completos y no haya inconsistencias. Si no están completos se tomará la información faltante de la historia clínica. También, el asistente llenará información de otros resultados de laboratorio le fueron ordenados y revisará la historia clínica para 1) saber si fue posible confirmar otros diagnósticos que explicaran el síndrome febril, como por ejemplo infección urinaria, enfermedad viral eruptiva, entre otros; 2) identificar el manejo clínico y su concordancia con el protocolo de manejo de dengue de la guía nacional de dengue, 3) número de veces que re-consultó dentro del mismo episodio, 4) si el sujeto fue hospitalizado durante el episodio actual y total días de hospitalización y 5) el total y tipo de medicamentos prescritos.

Esta misma persona va a estar haciendo seguimiento a los diagnósticos de sospecha de dengue en la base de datos de la historia clínica institucional y de las pruebas de estudio efectivamente realizadas, con el fin de calcular dos indicadores de solicitud de pruebas diagnósticas de dengue: 1) porcentaje de historias clínicas con sospecha clínica de dengue en quienes se solicitó prueba diagnóstica de dengue y 2) porcentaje de pruebas de estudio realizadas del total de pruebas solicitadas. Estos indicadores se calcularán quincenalmente en los primeros 3 meses del estudio y luego mensualmente hasta completar la muestra. Si el porcentaje de muestras realizadas sobre pruebas solicitadas es inferior al 95% se investigará cada caso individual para identificar las causas de la realización de la prueba diagnóstica. El indicador de pruebas solicitadas se utilizará para identificar las historias clínicas en las cuales se sospechó dengue pero no se solicitaron las pruebas de estudio y obtener la misma información que se obtiene para los sujetos en quienes si se solicitaron las pruebas: 1) si fue posible confirmar otros diagnósticos que explicaran el síndrome febril, 2) identificar el manejo clínico y su concordancia con el protocolo de manejo de dengue de la guía nacional de dengue, 3) número de veces que re-consultó dentro del mismo episodio, 4) si el sujeto fue hospitalizado durante el episodio actual y total días de hospitalización y 5) el total y tipo medicamentos prescritos.

Plan de análisis:

Se iniciará con un análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el estudio para lo cual se utilizarán proporciones con su intervalo de confianza del 95% en las variables cualitativas categóricas y promedio con desviación estándar o mediana y rangos en las variables cuantitativas según corresponda. Se estimará el porcentaje final de los indicadores de solicitud de pruebas diagnósticas (ver sección anterior) Anticipamos que el indicador de muestras solicitadas estará alrededor del 80%. Si es superior, es decir que más del 80% de los casos con sospecha se les solicitan pruebas diagnósticas se afectaría el poder estadístico para detectar diferencias en el manejo clínico cuando se comparan las pruebas con el grupo de sujetos en quienes no se realizaron, por lo cual se realizaría el análisis descriptivo y un cálculo de poder estadístico. Se estimará el porcentaje de resultados indeterminados de las pruebas realizadas. Los resultados indeterminados (o equívocos) no serán incluidos en los análisis posteriores.

Para estimar la sensibilidad de las pruebas de estudio se tendrán en cuenta los resultados de las pruebas de oro considerando como dengue un resultado positivo por RT-PCR, o aislamiento viral positivo, o IHA $\geq 1:2560$ (Figura 3). Para ser clasificado como no-dengue, tanto el RT-PCR como el aislamiento viral deberán ser negativos. En este cálculo no se tendrá en cuenta el resultado de la prueba de estudio con el fin de evitar el sesgo de incorporación. Sin embargo, debido a que se ha observado que NS1 tiene la capacidad de detectar dengue en muestras tempranas PCR negativas se obtendrá la frecuencia de falsos negativos del PCR en tiempo real utilizando como denominador el total de muestras con resultado positivo en cualquiera de las pruebas incluyendo el componente NS1 del Dengue DuoTM.

Se utilizarán tablas de contingencia (2x2) con el fin de calcular la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% por separado para IgM/IgG, NS1 sola, NS1/IgM y NS1/IgM/IgG general. Para efectos del análisis se considerará un resultado probable de

dengue como dengue. La probabilidad post-test se estimará utilizando el nomograma de Fagan (Guyatt et al. 2008). La sensibilidad y especificidad de las pruebas IgM/IgG y NS1/IgM/IgG se comparará utilizando la prueba Chi2 para muestras independientes y las razones de probabilidad se compararán utilizando el método de transformación logarítmica de Roldán y Luna. (Roldan-Nofuentes y del Castillo 2007).

Con el fin de describir el efecto de tiempo de inicio de síntomas (0-3 días, 3-6 días y 7 días o más), tipo de infección (primaria y secundaria), serotipo viral (DENV1-4) y gravedad de la infección en la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, y razones de probabilidad se usarán tablas 2x2 para IgM/IgG y NS1/IgM/IgG versus el estándar de oro en cada uno de los estratos correspondientes.

El cumplimiento del protocolo de manejo clínico de dengue se definirá por uno de los investigadores al comparar las órdenes médicas registradas en la historia clínica con la guía nacional de dengue, en la cual se definen conductas según la clasificación clínica de dengue y factores de riesgo. La gravedad del cuadro clínico será obtenida de la historia clínica como 1) la conclusión del médico quien prestó la atención y 2) la opinión del investigador con base en la descripción de los hallazgos y factores de riesgo. Se comparará la concordancia de las opiniones del médico tratante y el investigador con base en el índice kappa ponderado para variables ordinales con su correspondiente intervalo de confianza del 95%. Las diferencias en el cumplimiento del protocolo, la frecuencia de complicaciones, muerte, hospitalización, el total de pruebas de laboratorio (diferentes a diagnóstico de dengue) y del y tipo de medicamentos prescritos será evaluada utilizando la prueba Chi2 para muestras independientes. Las diferencias en el total de medicamentos prescritos serán evaluadas con la prueba t de Student o pruebas no paramétricas según su distribución. Se elaborarán curvas de sobrevida para la estancia hospitalaria que se compararán con la prueba de logaritmos del rango (Logrank). Finalmente, se construirán modelos de regresión múltiple para ajustar por factores de confusión y estimar el impacto en los desenlaces atribuible a la realización de las pruebas diagnósticas. Los modelos de regresión se construirán con base en el tipo de variable desenlace (regresión logística para variable desenlace binaria, regresión de Cox para variable desenlace de sobrevida y regresión lineal para variables cuantitativas). Se utilizará el método backward para obtener el modelo final, iniciando con aquellas variables que estuvieron asociadas ($P < 0,1$) con el desenlace en el análisis univariado. Se realizarán las pruebas de ajuste del modelo según corresponda. Para todos los análisis se usará el programa STATA 10.0 y se considerará un valor $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

10. DISPOSICIONES VIGENTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

En el presente estudio se incluirán muestras de suero que lleguen a los laboratorios clínicos de las entidades de salud participantes de sujetos de ambos sexos y cualquier grupo de edad a quienes el médico tratante hace una impresión diagnóstica de dengue y solicita una prueba diagnóstica. En el presente estudio se ha decidido aleatorizar las muestras y no los sujetos debido al efecto que podría tener sobre la conducta médica el conocimiento de la prueba que se va a realizar. Así mismo se solicita la exención del consentimiento informado debido a que los sujetos participantes al conocer que participan en una investigación de pruebas diagnósticas podrían, aún involuntariamente, afectar la

conducta médica. Adicionalmente, se consideran las limitaciones que existen para la obtención del consentimiento informado firmado. Estas limitaciones consisten en 1) el estudio se realizará en varias entidades de salud de 4 regiones del país en forma simultánea lo que demandaría la contratación de al menos 100 personas diferentes por toda la duración del estudio con costos que hacen inviable este tipo de estudios, y 2) el médico tratante en las entidades de salud dispone de tiempo limitado para la atención de las personas que acuden a la consulta por lo cual no es factible que ellos dediquen más del tiempo destinado para la consulta a los sujetos para explicar el estudio y obtener el consentimiento informado junto con el diligenciamiento de un formato de información básico. Una alternativa sería realizar el estudio en un número menor de entidades de salud pero esto prolongaría el tiempo de recolección de las muestras a más de 3 o 5 años en vez de los 14 meses planeados lo que así mismo incrementa los costos y hace no financiable el estudio aún con fondos de varias entidades. Consideramos solicitar la dispensa del consentimiento informado por las siguientes razones: 1) En el presente estudio no se afectarán los servicios de diagnóstico a que tienen acceso actualmente las personas a quienes se les solicita la prueba diagnóstica de dengue, en las instituciones prestadoras de servicios de salud donde se realizará el estudio se dispone en forma rutinaria de ninguna o solo de la pruebas IgM/IgG para dengue y todas las personas van a obtener el resultado de este examen. En otras palabras el servicio que actualmente se ofrece continúa. 2) Los sujetos cuyas muestras sean aleatorizadas para ser procesadas por la prueba NS1/IgM/IgG se beneficiarán al obtener un resultado con pruebas adicionales; sin embargo, esto no garantiza que los resultados generen cambios en la conducta médica por lo cual no se puede asegurar que se les estaría brindando un beneficio adicional al que recibirían las personas a quienes se les realiza la prueba IgM/IgG. Esta es precisamente una de las preguntas que se espera responder con el presente estudio. Al final del estudio esperamos que los futuros sujetos a quienes se les sospecha dengue se beneficien de la disponibilidad de una prueba diagnóstica sensible y útil para la decisión de su tratamiento médico. 3) Las muestras almacenadas serán utilizadas para realizar las pruebas de referencia cuyos resultados serán devueltos a la historia clínica de cada uno de los individuos y 4) En el presente estudio no se tomarán muestras de sangre adicionales a las ya solicitadas por el médico tratante.

Los riesgos del presente estudio se relacionan con la confidencialidad de los datos tomados de la historia clínica y de las pruebas diagnósticas. Los datos serán tomados y revisados solo por personal vinculado directamente al estudio. Los resultados de las pruebas de laboratorio tendrán su manejo habitual en las entidades de salud y para el estudio se utilizará el código equivalente al número de la historia clínica y otro código adicional para la base de datos. El procesamiento de la muestra por otra prueba diagnóstica de dengue no generará ningún costo ni afectará la decisión de atención clínica a que tiene derecho el sujeto.

La información que permita la identificación de los sujetos de estudio será conocida únicamente por el personal de salud directamente relacionado con la atención del paciente y por el equipo de investigación. En la base de datos no se incluirá el nombre del participante ni su dirección pero sí su documento de identidad. Esta información se requiere para la trazabilidad de los datos y correlación de la información clínica y de laboratorio. Los resultados obtenidos de las pruebas de estudio serán informados lo antes posible al médico tratante y a los participantes con el fin de ser usados en la atención clínica. Por el contrario, los resultados de las pruebas de oro son más demorados y no estarán disponibles al momento de la atención médica. Sin embargo, los

resultados de las pruebas de oro serán entregados a la institución correspondiente para que sean incluidos en la historia clínica del participante para que estén disponibles en una consulta futura.

En la prueba de inhibición de la hemaglutinación se utiliza antígeno de virus dengue obtenido en cerebro de ratón lactante. Para el presente estudio ésta prueba será realizada por el grupo VIREM que cuenta con la aprobación del comité de ética de animales de la Universidad del Valle para el uso y manipulación de ratones en pruebas biológicas con fines de diagnóstico virológico.

11. PRODUCTOS DEL PROGRAMA:

Logros	Metas	Indicadores
Identificar si las pruebas de diagnóstico rápido para dengue tienen un buen desempeño en condiciones reales de los servicios de salud en Colombia	Establecer la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad de dos pruebas de diagnóstico rápido de dengue en condiciones de la rutina de los servicios de salud en Colombia	Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad de las pruebas rápidas de diagnóstico de dengue cuantificadas
Identificar si la prueba diagnóstica de dengue que combina antígenos y anticuerpos tiene un mejor desempeño que solo la detección de anticuerpos en condiciones reales de los servicios de salud en Colombia	Establecer si existen diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad, especificidad y razones de probabilidad entre las dos pruebas rápidas de diagnóstico de dengue	Prueba estadística para datos no pareados calculada
Establecer al impacto de las pruebas diagnósticas para dengue basadas en condiciones de la rutina de los servicios de salud.	Establecer si a los pacientes a quienes se les realizan pruebas diagnósticas para dengue les va mejor en términos clínicos y de menor uso de los recursos de los servicios de salud que a quienes no se les solicitan pruebas diagnósticas de dengue.	Diferencias estadísticas en la frecuencia de hospitalización, complicaciones, muerte y promedio de medicamentos prescritos, otras pruebas de laboratorio solicitadas, y días estancia en sujetos a quienes se les solicitaron pruebas diagnósticas de dengue comparados con quienes no se les solicitaron calculadas.
Establecer el impacto clínico y en los servicios de salud de la utilización de pruebas de diagnóstico de dengue basadas en la detección	Establecer si a los pacientes a quienes se les realizó prueba diagnóstica para dengue (NS1/IgM/IgG) les va mejor en términos clínicos y	Diferencias estadísticas en la frecuencia de hospitalización, complicaciones, muerte y promedio de medicamentos prescritos, otras pruebas de

<p>simultánea de antígenos y anticuerpos comparada con la detección de anticuerpos en condiciones de la rutina de los servicios de salud.</p>	<p>de menor uso de los recursos de los servicios de salud que a quienes les realizó IgM/IgG</p>	<p>laboratorio solicitadas, y días estancia en sujetos a quienes se les solicitaron pruebas diagnósticas NS1/IgG/IgM vs IgM/IgG calculadas.</p>
---	---	---

12. RESULTADOS DEL PROGRAMA

Generación de nuevo Conocimiento:

Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Generar conocimiento con relación al rendimiento de las pruebas diagnósticas para dengue basadas en condiciones de la rutina de los servicios de salud en Colombia	Informe final (1), publicación (1) y ponencias (2) de los resultados del estudio	4	Esta información es útil para la comunidad científica nacional e internacional que investiga en dengue. Particularmente, la comunidad científica podrá conocer el rendimiento de las pruebas NS1 sola o en combinación con la detección de anticuerpos en diferentes contextos epidemiológicos, producir nuevos desarrollos en métodos diagnósticos y valorar la potencial utilidad de la inclusión de estas pruebas en algoritmos diagnósticos para aplicar en investigaciones en dengue y en estudios posteriores de impacto, costo-efectividad, evaluación de vacunas y detección precoz de epidemias.
Generar conocimiento con relación al impacto de las pruebas diagnósticas para dengue basadas en condiciones de	Informe final (1), publicación (1) y ponencias (2) de los resultados del estudio	4	Esta información es útil para las autoridades de salud a nivel nacional e internacional, las entidades promotoras y las instituciones de servicios de salud y la comunidad en general. El conocimiento generado proveerá un insumo para la toma de decisiones con relación a la implementación o no de pruebas

la rutina de los servicios de salud en Colombia

rápidas de diagnóstico de dengue en Colombia

Apropiación Social del Conocimiento:

Publicación	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículo en revista indexada	Comunicación de los resultados de investigación de validez e impacto de las pruebas diagnósticas para dengue en condiciones reales de los servicios de salud	2	Comunidad científica nacional e internacional, autoridades de salud nacional e internacional, EPSs, IPSs, comunidad
Ponencias en congreso nacional e internacional	Presentación de los resultados de investigación de validez e impacto de las pruebas diagnósticas para dengue en condiciones reales de los servicios de salud	2	Comunidad científica nacional e internacional, autoridades de salud nacional e internacional, EPSs, IPSs, comunidad
Informe ejecutivo	Difusión de los resultados a la comunidad en general a ser publicado en internet	1	Comunidad en general

Fortalecimiento Comunidad Científica

Formación	Descripción	Personas	Beneficiario
Estudiantes postgrado	Entrenamiento de estudiantes de maestría	3	Comunidad científica nacional e internacional
Jóvenes investigadores	Entrenamiento de profesionales con interés por desarrollar carrera en investigación	2	Comunidad científica nacional

Proyecto: “Ensayo clínico aleatorizado multicéntrico de la validez e impacto de pruebas diagnósticas para dengue en sujetos con síndrome febril”

Programa: “AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su impacto en la sociedad”

Estudiantes de pregrado	Entrenamiento en el desarrollo de investigación y evidencias en salud	2	Comunidad científica nacional
-------------------------	---	---	-------------------------------

13. IMPACTOS DEL PROGRAMA

Impacto esperado	Año	Descripción
Calidad y oportunidad en la prestación de servicios a personas con sospecha clínica de dengue	2015	Disponibilidad de un método de diagnóstico válido para dengue en las entidades de salud de Colombia. Supuesto: Evidencia del rendimiento adecuado de las pruebas NS1 y anticuerpos para dengue en Colombia y adquisición de los productos por las entidades de salud. Indicador: Porcentaje de entidades de salud que usan un método válido de diagnóstico de dengue
Mejoría en el atención oportuna de los pacientes con dengue que conduzca a reducción de las complicaciones y muertes	2018	Reducción de la Mortalidad atribuible a dengue en los departamentos cuyas entidades de salud han adoptado métodos válidos de diagnóstico de dengue. Supuesto: rendimiento adecuado de las pruebas y uso de sus resultados para manejo oportuno de los sujetos con dengue. Indicador: tasa de letalidad de dengue
Impacto epidemiológico en la población	2018	Lograr confirmación de la mayoría de casos de dengue por métodos de laboratorio y no como casos probables. Supuesto: Uso de las pruebas de laboratorio basadas en NS1 y llenado adecuado del formato de reporte de caso. Indicador: Porcentaje de casos de dengue que son reportados al sistema de vigilancia como confirmados

Impacto Socioeconómicos	2018	Disminución de la discapacidad y costos para la familia, las empresas y los servicios por un diagnóstico precoz y manejo oportuno y adecuado de los casos de dengue. Supuesto: Protocolos de diagnóstico y manejo del dengue validados e implementados exitosamente. Indicador: Días de incapacidad laboral e inasistencia escolar por dengue, costos de atención por hospitalización y atención de sujetos con dengue
Impacto científico y tecnológico	2015	Comprensión del rendimiento de pruebas diagnósticas de dengue en diferentes contextos epidemiológicos de transmisión de dengue y de los factores. Supuesto: Recolección y procesamiento adecuado de muestras y datos en el estudio. Indicador: Porcentaje de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad de las pruebas rápidas general y estratificado por fuentes de heterogeneidad
Impacto científico y tecnológico	2015	Comprensión del efecto que las pruebas diagnósticas tienen en la evolución clínica de los sujetos y el uso de recursos de los servicios de salud. Supuesto: Recolección y procesamiento adecuado de muestras y datos en el estudio. Porcentaje y promedio de indicadores de impacto (hospitalización, complicaciones, muerte, días estancia, etc.) en sujetos en quienes se realiza o no se realizan pruebas diagnósticas de dengue
Impacto científico y tecnológico	2018	Información crítica para identificar potencial uso de pruebas rápidas de diagnóstico en evaluación de vacunas y detección de epidemias. Supuesto: Candidatos a vacuna no tienen reacción cruzada con las pruebas diagnósticas. Indicador: Porcentaje de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas en cada sitio de estudio.
Impacto científico y tecnológico	2015	Fortalecimiento de la capacidad tecnológica para evaluación de pruebas diagnósticas de dengue. Supuesto: Muestras recolectadas y procesadas en los laboratorios de la Red. Indicador Porcentaje de muestras procesadas que tuvieron resultados interpretables
Ambiente y sociedad	2020	Mejoría de la calidad de atención en los servicios de salud. Supuesto: Personal de salud aplica evidencia de uso de pruebas diagnósticas. Indicador: Porcentaje de personas con sospecha diagnóstica de dengue que dicen sentirse bien atendidas

14. COBERTURA

La ejecución del proyecto será en 6 municipios endémicos de Dengue en Colombia: Barrancabermeja, Bucaramanga, Cali, Yopal, Villavicencio y Cúcuta.

15. CRONOGRAMA

N° Actividad	Actividad	Inicio	Final	Ejecución en
1	Aprobaciones	01/01	03/01	3 meses
2	Vinculación personal	01/01	05/01	5 meses
3	Elaboración de propuesta	02/01	05/04	4 meses
4	Adquisición de Insumos	04/01	07/02	16 meses
5	Prueba piloto formatos y procedimientos	05/01	05/04	1 mes
6	Diseño y prueba de bases de datos	06/01	06/04	1 mes
7	Análisis de muestras por pruebas de estudio	07/01	07/02	12 meses
8	Recolección de la información	07/01	07/02	12 meses
9	Análisis de muestras por estándar de oro	03/02	08/02	6 meses
10	Ingreso y control de calidad de datos	09/01	03/03	19 meses
11	Análisis de datos	05/02	07/03	15 meses
12	Informe de avance 1	12/01	12/01	1 mes
13	Informe de avance 2	11/02	11/02	1 mes
14	Presentación de congresos	07/03	09/03	3 meses
15	Preparación y envío del manuscrito	05/02	09/02	5 meses

16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

El presente estudio está basado en la ausencia de evidencia acerca de la utilidad de las pruebas rápidas de diagnóstico de dengue en la rutina de los servicios de salud, uno de los posibles riesgos es que se tenga información por otras vías o se proponga en el muy corto plazo otra prueba diagnóstica diferente a las que se están evaluando. Hasta donde conocemos no existe en el momento un estudio en desarrollo que responda esta pregunta de investigación. En la actualidad la OMS realiza estudios de validez de pruebas diagnósticas basadas en la detección de NS1 pero no en condiciones reales de los servicios de salud ni de evaluación de impacto. Si estos estudios se estuvieran realizando y no los conocemos de todas maneras no necesariamente serían aplicables a las condiciones del país debido a que Colombia es una zona hiperendémica (con circulación de los 4 serotipos) y se tiene una cobertura superior al 70% de vacuna de fiebre amarilla (un factor de reacción cruzada con pruebas de diagnóstico de dengue). De igual manera no estamos al tanto de que se encuentre en producción o desarrollo avanzado una prueba diagnóstica para dengue diferente a las que se están proponiendo y que estén dirigidas a ser usadas en los servicios de salud (bedside lab tests) como las que proponemos evaluar. Los resultados del presente estudio serían informativos para la toma de decisiones con relación a la implementación de métodos diagnósticos de dengue en general. Se anticipan posibles dificultades inherentes a la coordinación de los estudios multicéntricos por lo cual se han incluido en los presupuestos viajes de implementación y monitoría y personal responsable en cada uno de los sitios de estudio. El transporte y almacenamiento de las muestras es crítico por lo que se ha considerado en el presupuesto. Problemas con las muestras tendrían un altísimo impacto en el objetivo de validar las pruebas diagnósticas pero se tomarán las medidas para prevenir que esto ocurra, los grupos participantes tienen experiencia en la manipulación adecuada de muestras de estudios colaborativos anteriores en las ciudades de Cali, Bucaramanga, Barranquilla y Neiva.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:376-81.

2. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet M, Talarmin A, Rice C, Flamand M. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp* 2006;277:233-47; discussion 47-53.
3. Arya S, Agarwal N. NS1 detection in addition to new dengue antibody assay with differential detection of IgG and IgM antibodies. *Clin Biochem* 2010;43:537; author reply 8.
4. Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1513-8.
5. Bessoff K, Phoutrides E, Delorey M, Acosta L, Hunsperger E. Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:949-53.
6. Blacksell S, Doust J, Newton P, Peacock S, Day N, Dondorp A. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:775-84.
7. Blacksell S, Mammen MJ, Thongpaseuth S, et al. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:43-9.
8. Blacksell S, Newton P, Bell D, et al. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. *Clin Infect Dis* 2006;42:1127-34.
9. Castro-Jorge L, Machado P, Fávero C, et al. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *J Med Virol* 2010;82:1400-5.
10. CDC, PAHO. Dengue laboratory diagnostic procedures for the Americas. In: *Laboratories SJ*, ed. San Juan, Puerto Rico; 1981:17-122.
11. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:83-4.
12. Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol* 2004;31:185-9.
13. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:43-8.
14. de Oliveira Poersch C, Pavoni D, Queiroz M, et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol* 2005;32:272-7.
15. Deeks J, Altman D. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ* 2004;329:168-9.
16. Deen J, Harris E, Wills B, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 2006;368:170-3.
17. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1185-9.

18. Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e280.
19. Group E-BMW. Evidence Based Medicine: A new approach to teaching the practice medicine. *JAMA* 1992;268:2420-25.
20. Glas A, Lijmer J, Prins M, Bossel G, Bossuyt P. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1129-35.
21. Grupo Enfermedades Transmitidas por Vectores. Boletín de Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2010.
22. Guyatt G, Drummond R, Meade M, Cook D. User's guides to the medical literature: a manual for evidence-based clinical practice. 2nd edition ed: McGraw Hill; 2008.
23. Guzman M, Jaenisch T, Gaczkowski R, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4.
24. Hang V, Nguyet N, Trung D, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e360.
25. Houghton-Triviño N, Montaña D, Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2008;10:299-307.
26. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui N, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol* 2010;47:49-53.
27. Knottnerus J, Muris J. Assessment of the accuracy of diagnostic tests: the cross-sectional study. *J Clin Epidemiol* 2003;56:1118-28.
28. Knottnerus J, van Weel C, Muris J. Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ* 2002;324:477-80.
29. Kumarasamy V, Chua S, Hassan Z, et al. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Singapore Med J* 2007;48:669-73.
30. Kumarasamy V, Wahab A, Chua S, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods* 2007;140:75-9.
31. Kuno G, Gómez I, Gubler D. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991;33:101-13.
32. Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G, Vorndam A. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:545-51.
33. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:387-91.
34. Lima MR, Nogueira R, Schatzmayr H, dos Santos F. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e738.
35. Martinez R, Diaz F, Villar L. [Evaluation of the World Health Organization clinical definition of dengue]. *Biomedica* 2005;25:412-6.
36. Martinez-Vega R, Diaz-Quijano F, Coronel-Ruiz C, Yebraíl Gomez S, Villar-Centeno L. [Evaluation of PANBIO rapid immunochromatographic cassette for dengue diagnosis in a Colombian endemic area]. *Biomedica* 2009;29:616-24.
37. McBride W. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:31-6.

38. Ministerio de la Protección Social. Circular 009. Alerta epidemiológica por dengue y declaración de alerta hospitalaria. In. Bogotá D.C.; 12 de febrero de 2010.
39. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar L, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology Journal*. 2010;7:361
40. Phuong H, Thai K, Nga T, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;63:372-8.
41. Pok K, Lai Y, Sng J, Ng L. Evaluation of Nonstructural 1 Antigen Assays for the Diagnosis and Surveillance of Dengue in Singapore. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010.
42. Qiu L, Di B, Wen K, et al. Development of an antigen capture immunoassay based on monoclonal antibodies specific for dengue virus serotype 2 nonstructural protein 1 for early and rapid identification of dengue virus serotype 2 infections. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:88-95.
43. Ramirez A, Moros Z, Comach G, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:247-53.
44. Rigau-Perez J. Case definition for dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:80.
45. Rojas Alvarez D. Informe sobre dengue en Colombia durante 2007. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional 2008;13:113-24.
46. Rojas Alvarez D. Informe sobre dengue en Colombia durante 2010. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional 2011;16(1):1-11.
47. Roldán-Nofuentes J, Del Castillo JD. Comparison of the likelihood ratios of two binary diagnostic tests in paired designs. *Stat Med* 2007;26:4179-201.
48. Sackett D, Haynes R. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. *British Medical Journal* 2002;324:539-41.
49. Sackett D, Haynes R. The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324:539-41.
50. Shu P, Yang C, Kao J, et al. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:589-91.
51. Singh M, Majumdar M, Singh G, et al. NS1 antigen as an early diagnostic marker in dengue: report from India. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:50-4.
52. Tricou V, Vu H, Quynh N, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis* 2010;10:142.
53. WHO/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. France: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2009.
54. Wang S, Sekaran S. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:690-5.
55. Wichmann O, Stark K, Shu P, et al. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infect Dis* 2006;6:120.
56. Zainah S, Wahab A, Mariam M, et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *J Virol Methods* 2009;155:157-60.