

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

**Proyecto 6**

**“Diseño de tecnologías para el diagnóstico y pronóstico rápido del dengue”**

**Programa**

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

<b>Investigador principal:</b>	<b>RAQUEL ELVIRA OCASIONEZ <sup>1</sup></b>
<b>Coinvestigadores:</b>	<b>IRENE BOSCH <sup>2</sup></b> <b>ELSA MARINA ROJAS <sup>1</sup></b>
<b>Investigadores Asociados:</b>	<b>ANILZA BONELO <sup>3</sup></b>
<b>Consultor Nacional:</b>	<b>JAIRO RODRÍGUEZ <sup>4</sup></b>
<b>Consultor Internacional:</b>	<b>LEE GEHRKE <sup>2</sup></b>

1 Universidad Industrial de Santander.

2 Massachusetts Institute of Technology (MIT).

3 Universidad del Valle.

4 Universidad Surcolombiana.

## TABLA DE CONTENIDO

1. TITULO .....	3
2. RESUMEN EJECUTIVO.....	3
3. PALABRAS CLAVE:.....	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD .....	5
5. JUSTIFICACIÓN .....	6
6. OBJETIVOS .....	9
7. MARCOS DE REFERENCIA.....	9
8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA .....	14
9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA	14
10. METODOLOGÍA .....	15
11. PRODUCTOS .....	17
12. RESULTADOS .....	18
13. IMPACTOS .....	18
14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN.....	18
15. CRONOGRAMA POR FASES.....	19
16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES.....	19
17. BIBLIOGRAFÍA .....	19

## **1. TITULO**

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

Proyecto: “Diseño de tecnologías para el diagnóstico y pronóstico rápido del dengue”

## **2. RESUMEN EJECUTIVO**

Es primordial en la actualidad Colombiana e Internacional que se haga un diagnóstico rápido. Debido a que enfermedades como el dengue representan un problema de salud pública de grandes proporciones, donde se agotan los recursos disponibles para cubrir las necesidades de atención médica durante episodios epidémicos, es muy importante hacer un monitoreo de los casos en forma continua en el tiempo y alertar a los organismos del estado que actúen rápidamente en la posibilidad de epidemias. Tecnologías innovadoras en el área de diagnóstico no se han desarrollado en el país, sumado a esto, las pruebas diagnósticas que existen se consiguen a alto costo y son elaboradas en otros países. Consecuentemente, esta propuesta plantea usar tecnologías de punta que conduzcan a la elaboración de pruebas diagnóstica a bajo costo, rápidas y eficientes, que pueda ser ejecutada y utilizada en los laboratorios de investigación de Colombia.

La propuesta consiste en utilizar los recursos humanos y científicos en Colombia en combinación con una universidad en USA para poner en práctica un nuevo dispositivo diagnóstico con uso clínico de uso “puntual” y de capacidad inmediata de diagnóstico biológico. En un futuro permitiría que los individuos afectados, a pesar de estar lejos de las instalaciones de cuidados médicos u hospitales, puedan contar con la posibilidad de un diagnóstico diferencial y tomar acciones inmediatas, asegurando tempranamente un mejor manejo médico.

Nuestras metas para la fase de exploración o piloto (Fase I) son el desarrollo de un prototipo de diagnóstico rápido para el dengue (serotipos 1-4) en una matriz de códigos que sea interpretada en forma digital. Este dispositivo lo hemos denominado Matriz de diagnóstico multiplex-AEDES (MDM-AEDES). El prototipo ofrecerá la identificación directa de los cuatro serotipos del virus dengue mediante la detección de la proteína viral NS1 circulante, así como su identificación indirecta mediante la detección de anticuerpos circulantes (IgM e IgG) contra las proteínas virales. Esta matriz de diagnóstico podrá ser interpretada por un dispositivo óptico, y convertida en un mensaje de texto, esto con el fin de que la información pueda ser transferida electrónicamente a una base de datos y ser posicionada geográficamente en el punto de toma de la muestras. Para la fase de desarrollo (FASE II), nuestros objetivos serán la implementación en la práctica de dichos dispositivo y la detección de la presencia de otros agentes infecciosos distintos al dengue, pero que puedan tener sintomatología parecida, como es el caso de la leptospirosis. Adicionalmente, la detección de dos citoquinas asociadas a la severidad de la enfermedad, como prueba pronóstica (ST2 y IP-10).

Las características operativas de la prueba realizada con el dispositivo multiplex MDM-AEDES (sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de probabilidad) serán

evaluadas utilizando muestras obtenidas en pacientes ambulatorios y hospitalarios de cinco zonas de alta incidencia de dengue en Colombia.

### **Abstract**

Dengue is an urban tropical endemic and epidemic disease including in Colombia, Its expansion in unprecedented and has generated a threat to Public Health, with growing number of cases and increasing in the severity of the disease in the Americas. A rapid and timely diagnosis is required early in the disease progression to provide proper medical care, as no therapies or vaccines are available. There is a need to be able to identifying patients at increased risk or complications in a timely manner and to prevent death in hemorrhagic fever cases. A worse prognosis is associated with the presence of neutralizing antibodies of a prior infection with another serotype, the presence of inflammatory factors and the genetic predisposition of the patient that may contribute to vascular leakage and shock. There are no current prognostic factors; some candidates that can be detected in serum or plasma have been tested in Colombia for their value as prognostic biomarkers whose levels in plasma correlated with the presence of severe disease. Among these are soluble factors and cytokines such as ST2 and IP-10 according to our preliminary clinical studies.

Rapid diagnostic tests for dengue should be easily transportable, stable during storage and easy to use and interpret. Those known as lateral flow tests (also called immunochromatographic tests) are currently available under a well-established platform which is simple and quick read but they have high cost and are not capable to detect the four different serotypes of dengue virus. A rapid test for early viral detection and monitoring of outbreaks is not currently available.

This proposal aims to develop a new device that uses blood samples obtained during the febrile phase of the disease which is able to establish four serotypes of dengue virus and provide a specific diagnosis (Fase I) and prognosis (Fase II) of patients with dengue and would allow simultaneously epidemiological information as the readout of the test is transmitted in real time via the utilization of mobile technology. This technology consists in the use of gold nanoparticles and cell phone technology, using optical recognition of a test for the NS1 viral antigen of dengue 1- 4, and circulating IgM an IgG for dengue and leptospirosis in addition to biomarkers of prognosis for severe forms of the disease. Therefore, the device will have multiplex capacity.

The development of these devices is possible through the cooperative work between researchers in the program AEDES-Colombia and the dengue laboratory at the Massachusetts Institute of Technology (MIT, USA).

In addition to its unique diagnostic capabilities, this tool will help to bridge the gap between the timely identification of cases of dengue and the distribution of health services in the areas of high priority during epidemics. The impact of this technological innovation is to offer real-time diagnostic and prognostic information to aid on decision-making, at the clinics and public health and public health levels.

In conclusion: We propose a new design or diagnostic device, including a (QR-code) bar code with two-dimensional matrix for optical reading that allows the use of cell phones to capture the digital information and communicate it in real time and translating it into a text form. Jointly, we propose new chemical methods of coupling antigens and antibodies to the gold microparticles, increasing the sensitivity and extend the capabilities of these particles in diagnostic methods. Because they are visually detectable antigen-antibody binding the immobilizer on a flat membrane to yield a positive band corresponding to the detection of the molecule of interest. Finally, we propose to develop a multiplex lateral flow in a single run (blood, serum or plasma). We propose to bring together an interdisciplinary team of scientists, engineers and doctors who can understand the biology, the immune

response to infectious agents, physical-chemical methods which are required to manufacturing and produce a new diagnostic device for dengue.

Our goals for the exploration/pilot (Phase I) are the development of a prototype fast diagnosis of dengue (serotypes 1-4) in a matrix of code that is interpreted in digitally. The Matrix-AEDES will detect all four dengue serotypes in blood, plasma or serum and the presence of IgM and IgG against dengue, as the initial phase. And the generation of a diagnostic array that is capable of being interpreted by an optical device and converted into text message. This information will be transferred electronically to a database and positioned geographically – which is the point of sampling. As a second phase, we propose further detect IgM and IgG specific for leptospirosis and the presence of ST2 and IP-10, two cytokines circulating and associated with the severity of dengue. The prototype provides 1) the direct identification of four different serotypes of dengue virus by detection of viral NS1 protein and 2) indirect identification of dengue virus by detecting circulating antibodies IgM and IgG. For the second phase (Phase II), our objectives will be the practical implementation of such device and detecting the presence of other infectious agents other than dengue, with similar symptoms, as is the case of leptospirosis, and the detection of two cytokines associated with the severity of the disease, as a multiplex diagnostic-prognostic test. The performance of the test (sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios) will be evaluated using samples from hospital in Bucaramanga. This phase II also includes assessing the predictive value of biomarkers ST2, IP-10 and potentially others identified during the development of the program AEDES.

### **3. PALABRAS CLAVE:**

Dengue, NS1, anticuerpos monoclonales, diagnóstico rápido, telefonía móvil, biomarcadores, severidad.

### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD**

Es primordial en la actualidad Colombiana e Internacional que se haga un diagnóstico rápido. Debido a que enfermedades como el dengue representan un problema de salud pública de grandes proporciones, donde se agotan los recursos disponibles para cubrir las necesidades de atención médica durante episodios epidémicos, es muy importante hacer un monitoreo de los casos en forma continua en el tiempo y alertar a los organismos del estado que actúen rápidamente en la posibilidad de epidemias. Tecnologías innovadoras en el área de diagnóstico no se han desarrollado en el país, sumado a esto, las pruebas diagnosticas que existen se consiguen a alto costo y son elaboradas en otros países. Consecuentemente, esta propuesta plantea usar tecnologías de punta que conduzcan a la elaboración de pruebas diagnóstica a bajo costo, rápidas y eficientes, que pueda ser ejecutada y utilizada en los laboratorios de investigación de Colombia.

El enfoque de esta propuesta es el diagnóstico precoz de los cuatro serotipos del virus dengue en el campo, es decir sin necesidad de sofisticados centros de diagnostico, esto permitirá la entrega rápida de resultados diagnósticos a los médicos tratantes con el fin de facilitar la vigilancia médica de los pacientes.

Aunque esta propuesta se basa en la tecnología estándar de cromatografía de flujo lateral, se propone introducir varias innovaciones claves con un impacto significativo potencial. En primer lugar, generaremos nuevos reactivos valiosos en forma de anticuerpos específicos contra los diferentes serotipos del virus (anti-dengue monoclonales). En segundo lugar, se optimizará la detección de los conjugados mediante el uso de nanopartículas de oro, que permiten la visualización de los resultados por el ojo humano o por una cámara simple (en el teléfono celular); resultados que pueden ser transmitidos en forma inmediata. Dichas partículas serán elaboradas en forma doméstica en el laboratorio, lo cual permitirá disminuir los costos del dispositivo mediante la utilización de reactivos propios, e incrementará la sensibilidad y especificidad de la técnica. En tercer lugar, se planea ensamblar y probar una Matriz de diagnóstico Multiplex (MMDx), con capacidad para ser leída por un aparato celular, que a su vez cargara los datos de ubicación geográfica y serotipo viral a una base, permitiendo un mapeo epidemiológico en tiempo real, lo cual podría cambiar radicalmente la manera en que las epidemias de la enfermedad son identificadas y monitoreadas. Normalmente estos dispositivos se encuentran con un costo por encima de \$10US por prueba. Este costo es alto y por lo tanto limita su uso en forma generalizada. Como resultado de esta propuesta, el costo de dichas pruebas se reduce a un décimo del valor actual, debido a la elaboración propia de la nanopartículas de oro, y a la elaboración en el laboratorio de anticuerpos monoclonales que se acoplan a dicha partícula; con lo cual finalmente se dará una solución práctica al problema existente en la actualidad de no poseer un diagnóstico rápido y de bajo costo para el dengue. Esto sin contar que a futuro esta técnica podrá ser adaptada para realizar el diagnóstico de otras patologías de importancia presentes en el territorio nacional.

Nos proponemos desarrollar una prueba rápida de diagnóstico que distinga entre a los cuatro serotipos del dengue. Este tipo de diagnóstico es novedoso y no existe hoy en día; su importancia radica en que la introducción de una nueva cepa del dengue en un área endémica podría dar lugar a una mayor incidencia de dengue hemorrágico, debido al mecanismo de mejora dependiente de anticuerpos (4), lo que representa una amenaza significativa y una justificación para la detección de múltiples serotipos. La identificación de diferentes serotipos del dengue en una sola área geográfica era inusual hace unas décadas, pero en la actualidad es cada vez más común.

En resumen, el objetivo de este proyecto es realizar la detección de los cuatro serotipos virales del dengue y determinar de la respuesta inmune al dengue, en una sola muestra del paciente mediante el uso de la inmunodifusión. De ser posible, el resultado será interpretado digitalmente y enviado a una base de datos que permitiría hacer un seguimiento en tiempo real de los casos diagnosticados.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

El dengue es una enfermedad endémo-epidémica de las regiones urbanas ubicadas en el trópico de Colombia, Latinoamérica y el mundo, de origen viral y transmisión vectorial. Su expansión en las últimas décadas generó una amenaza para la salud pública, debido al creciente número de casos y el aumento en la severidad de la enfermedad. Al no existir vacuna ni terapia antiviral específica, la única forma de garantizar la sobrevivencia de los casos graves es a través de la vigilancia médica, para lo cual es necesario diagnosticar de manera rápida y oportuna a los pacientes con dengue. Sin embargo en la actualidad,

resulta difícil realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, ya que esta en su fase febril inicial no se diferencia clínicamente de otras etiologías comunes presentes en estas zonas del mundo (por ejemplo la leptospirosis).

Un número importante de estudios han sido descritos para el diagnóstico del dengue (1, 2), métodos como la amplificación del genoma viral (RT-PCR), y los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), son utilizados en la actualidad para diagnosticar la enfermedad (3), pero presentan varias desventajas, entre ellas el ser de lectura lenta, metodología compleja, esto sumado a la necesidad de equipos especializados y personal entrenado. Asimismo, aunque se han desarrollado dispositivos de diagnóstico rápido para dengue, estos tienen un alto costo y sensibilidad variable, lo cual limita su implementación en la mayor parte del territorio nacional, especialmente las zonas más vulnerables, que a su vez suelen ser las más afectadas.

La Organización Mundial de la Salud establece que el proceso de diagnóstico debe ser accesible, sensible y específico, fácil de usar, rápido y robusto. Así mismo, es un requisito del diagnóstico viral que los métodos de laboratorio sean precisos e identifiquen tempranamente en el curso de la infección la presencia del virus y/o las inmunoglobulinas (ya sean de tipo IgM y/o IgG) generadas como respuesta a la infección. Idealmente se podría diseñar una prueba que permita saber el estado de gravedad del paciente, para que los pacientes con mayor riesgo de empeorar puedan tener un seguimiento cercano en los centros de atención, evitando con ello el desarrollo de complicaciones que conlleven a casos fatales. Sin embargo, en la actualidad no existe ninguna prueba disponible que permita saber, en términos de patogenia o pronóstico del dengue, como se encuentran los pacientes.

Hoy se conoce que un número indeterminado de infecciones secundarias se encuentran asociadas a la posibilidad de desarrollar formas severas de la enfermedad. Fenómeno que ha sido atribuido a la presencia de anticuerpos no neutralizantes (de tipo IgG), generados durante una infección previa por el virus dengue (por un serotipo viral diferente), y la presencia de algunos factores inflamatorios. Estas dos características sumadas, al parecer contribuirían con el desarrollo de la forma hemorrágica del dengue y por ende con los casos fatales, al mediar la exacerbación de los mecanismos patogénicos que conllevan a la extravasación vascular y al choque. Dichos anticuerpos y factores inflamatorios pueden ser detectados en el suero y/o plasma de los pacientes y son biomarcadores de valor pronóstico cuyos niveles se correlacionan con la presencia de enfermedad grave. Entre estos se destacan factores solubles y citoquinas como ST2 (Interleukin-1 receptor like-1 protein, IL-1RL) y la IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10), los cuales de acuerdo a estudios preliminares, podrían servir como base para el diseño de una prueba rápida de valor pronóstico.

Por ello se propone desarrollar un novedoso dispositivo de diagnóstico rápido que a partir de una pequeña muestra sanguínea obtenida durante la fase febril de la enfermedad, logre establecer rápidamente el diagnóstico y pronóstico del paciente, además de consolidar simultáneamente la información epidemiológica, gracias a que el resultado podrá ser interpretado por el teléfono celular y procesado en una base de datos con información sobre ubicación geográfica del caso y el serotipo viral. Para ello se utilizarán tecnologías como la incorporación al dispositivo de nanopartículas de oro y el uso del teléfono celular para el reconocimiento óptico de la prueba antígeno viral-anticuerpo (proteína circulante no estructural 1, NS1) y la detección de biomarcadores de severidad circulantes en el suero.

Las pruebas de diagnóstico rápido del dengue deben ser fácilmente transportables, estables durante almacenamiento y fáciles de usar e interpretar. Las pruebas de flujo lateral (o también llamadas pruebas de inmunocromatografía) actualmente disponibles para el dengue y otras enfermedades, conforman una plataforma bien establecida de lectura simple y rápida. Por lo que nos planteamos como objetivo, su elaboración doméstica a bajo costo, añadiéndole una novedosa capacidad semicuantitativa para la detección de anticuerpos o antígenos en una matriz de resultados. Esto teniendo en cuenta que el producto comercial disponible que utiliza la misma tecnología propuesta en este proyecto (DUO Standard Diagnostics - Korea), es de alto costo, no ofrece la posibilidad de que los resultados sean interpretados electrónicamente, ni permite un seguimiento epidemiológico en tiempo real. Más importante aún, no existe actualmente en el mercado un dispositivo que pueda distinguir los cuatro serotipos de dengue ni que pueda ser usado para pronóstico de la enfermedad severa. Por lo tanto, la propuesta es original y no tiene competidores comerciales hasta el momento.

Adicionalmente, se plantea incluir en este dispositivo la detección de otros agentes infecciosos que circulen en zonas endémicas de Dengue, y presenten una sintomatología similar a la de esta enfermedad, como es el caso de la leptospirosis (33). Por ello nos proponemos ampliar el uso de la tecnología rápida descrita en este proyecto, para obtener información sobre la prevalencia de leptospirosis en las zonas donde estudiemos la incidencia del dengue, mediante la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG reactivos a la *Leptospira*, los cuales serán incluidos en la matriz diagnóstica. Los casos que resulten positivos, serán confirmados en el laboratorio mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Además de su valor como herramienta de diagnóstico, la ejecución de una prueba rápida contribuirá a cerrar la brecha entre la identificación oportuna del caso de dengue y la prestación de los servicios de salud en las zonas de mayor prioridad o durante las epidemias. Puesto que actualmente la forma más eficaz de control del dengue es el control del vector, en los sitios donde se presenta un incremento en el número de casos la captura de información sobre diagnóstico viral en tiempo real se convertirá en un sistema de alerta temprana de la población. El uso de un dispositivo con capacidad diagnóstica y pronóstica del dengue contribuirá no solamente al manejo del paciente sino además logrará el seguimiento epidemiológico requerido en el campo de la Salud Pública.

El impacto esperado de esta innovación tecnológica es el de poder ofrecer en tiempo real información diagnóstica y pronóstica de utilidad para la toma de decisiones médicas, y alertar a los servicios de salud pública, para que contribuyan con el control de la infección en las zonas endémicas y sus secuelas en la población expuesta a dicho agente infeccioso.

La elaboración propia de este dispositivo es posible mediante el trabajo cooperativo entre investigadores de la red del Programa AEDES y el laboratorio de dengue del Massachusetts Institute of Technology (MIT, USA).

## **6. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Desarrollar un nuevo método de diagnóstico temprano del dengue, que identifique serotipo responsable, marcadores de predicción de su severidad, que determine presencia de *Leptospira* e informe en tiempo real a un centro de control epidemiológico.

### **Objetivos Específicos**

#### **FASE I.**

Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales anti-proteínas virales NS1 de dengue 1, 2, 3, 4, necesarias para elaborar el dispositivo de diagnóstico (MDM-AEDES).

Obtener una máxima sensibilidad de detección y especificidad diagnóstica mediante la optimización de anticuerpos / proteínas virales NS1 y su enlace con las nanopartículas (NP) de oro.

Diseñar la Matriz de Diagnóstico Multiplex de AEDES (MDM-AEDES), para evaluar la especificidad y la sensibilidad de la detección NS1 y la presencia de anticuerpos anti-dengue IgG / IgM en el laboratorio y desarrollar una interface de teléfono móvil para mostrar los resultados en tiempo real, que se transmitirán con una posición geográfica determinada por el dispositivo óptico (teléfono móvil) a una base de colección de datos localizada en la Bucaramanga.

#### **FASE II.**

Llevar a cabo las pruebas de validación para la detección del dengue utilizando muestras de suero almacenadas de pacientes con dengue.

Demostrar la capacidad de detección múltiple de MDM-AEDES mediante la ampliación de la capacidad de detección en el campo y no solamente en el laboratorio haciendo uso de estos dispositivos con muestras de pacientes en un número limitado de pacientes.

Crear y probar el dispositivo MDM-AEDES capaz de detectar dos patógenos al mismo tiempo, y preparar un dispositivo a escala mayor.

Implementar el diagnóstico para la detección del virus del dengue mediante el uso de muestras almacenadas del Proyecto AEDES en Colombia que tengan información clínica, para probar los valores predictivos de severidad denominados sST2 y IP10 y su relativa presencia.

## **7. MARCOS DE REFERENCIA**

### **Virus Dengue**

El virus del dengue es un miembro de la familia de los flavivirus, un pequeño virus, el ARN envuelto, con cuatro serotipos diferentes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Se transmite a los humanos principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Su agente infeccioso es responsable de tal vez unos 100 millones de infecciones en todo el mundo cada año (4). Aunque las infecciones de dengue ocurren en las áreas tropicales, sudeste de Asia y el Pacífico occidental, las infecciones de dengue son un fenómeno relativamente nuevo en el hemisferio occidental, con tendencia al incremento en las últimas dos décadas (5), incluyendo un brote de 2010 en Florida. En la actualidad, se

estima que 3 millones de personas corren el riesgo de la fiebre del dengue (DF) y fiebre hemorrágica del dengue (DHF), con una mortalidad anual medida en las decenas de miles. Brancoft (1906) identificó por primera vez al mosquito *Aedes aegypti* como el vector del Dengue y actualmente es el principal vector de esta enfermedad en América (41). Los cuatro serotipos del virus han sido aislados de mosquitos infectados naturalmente de esta especie; pero, otras especies como *Aedes albopictus*, *A. albifasciatus*, *A. mediovittatus*, *A. polinesiensis*, *A. scutellaris* y *A. niveus* pueden también mantener la transmisión (42).

El ciclo endémico y epidémico del virus Dengue es mantenido por el vector a través de la transmisión mosquito-hombre-mosquito, siendo el humano el huésped definitivo y reservorio del virus. La intensidad y tiempo de la transmisión dependen de la abundancia del vector y la presencia de humanos infectados con títulos altos de viremia, la cual comienza un día antes de la fiebre y se extiende hasta 6 u 8 días después del inicio de la enfermedad.

Luego de la picadura del mosquito y la introducción del virus en la piel del hospedero, sigue un periodo de incubación viral inaparente que puede variar entre 2 a 7 días. Al cabo de este tiempo la enfermedad comienza a manifestarse abruptamente con fiebre, cefalea y malestar general.

En Colombia cerca de 25 millones de personas están en riesgo de contagiarse, siendo una de las patologías infecciosas de mayor carga social y económica en el país<sup>39</sup>. Durante el 2010, un año epidémico, se reportó al Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud 157.152 casos de Dengue (9.482 casos severos), con 217 muertes atribuibles a ella<sup>40</sup>.

### **Leptospira**

La *Leptospira* son bacterias Gram negativas pertenecientes al orden *Spirochaetales* y a la familia *Leptospiraceae*; dentro de los factores de virulencia de las leptospiros patógenas se encuentran endotoxinas, hemolisinas, esfingomielinasas, fosfolipasa y proteínas superficiales de adherencia. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica infectocontagiosa que afecta en diferentes formas (aguda y crónica) a la mayoría de especies animales domésticas y silvestres, donde el hombre se ve comprometido a infectarse accidentalmente con la orina o los tejidos de animales que padecen la enfermedad. Con los cambios climáticos presentes en la actualidad, focos epidémicos de leptospirosis han sido detectados. En sus formas de presentación leve se manifiesta como una enfermedad de tipo influenza acompañada de dolor de cabeza y mialgias. En la forma severa se presenta ictericia disfunción renal y diátesis hemorrágica.

De acuerdo con la estructura antigénica las leptospiros se clasifican en serovares (serotipos) de los cuales se reconocen más de 200 en el mundo. Las investigaciones serológicas han demostrado que las infecciones por leptospira están ampliamente diseminadas en las poblaciones animales y humanas en países tropicales. Ciertos grupos ocupacionales se encuentran en alto riesgo de adquirir la enfermedad, como los médicos veterinarios, los trabajadores agrícolas, de los mataderos y de la industria pesquera, por exposición directa, o a través del agua o terrenos húmedos contaminados (aguas estancadas, canales, estanques, arrozales). En Humanos los serovares más frecuentes son: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicala*, *L. pomona*.

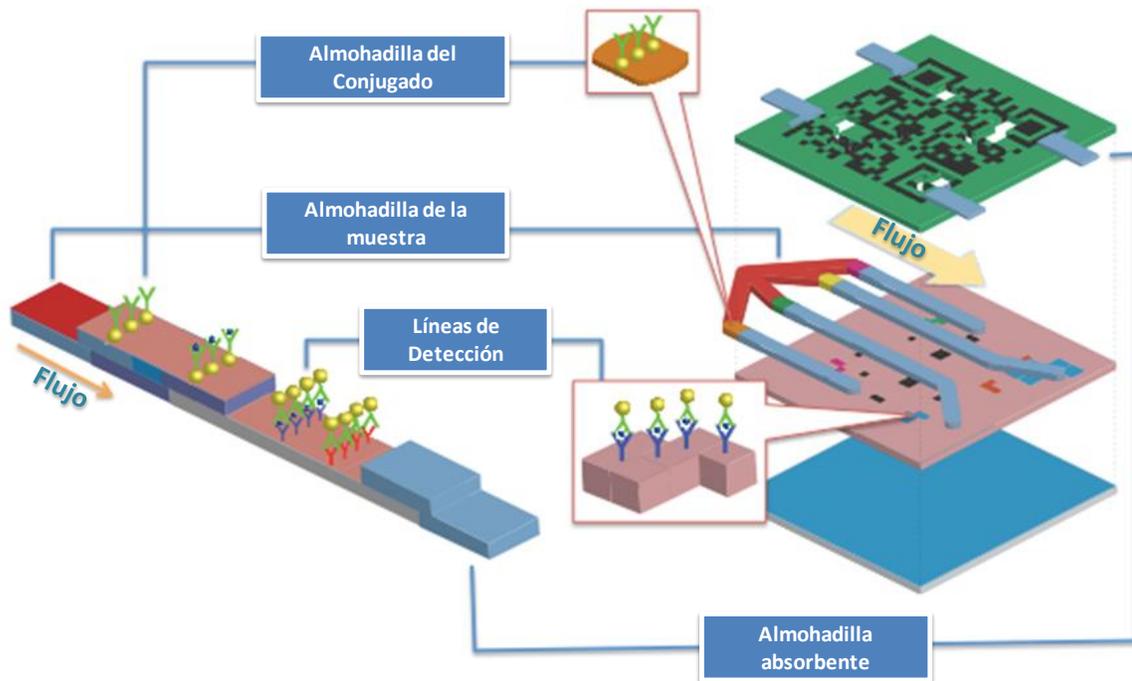
En Colombia existen pocos datos sobre prevalencia de la leptospirosis humana en población general, lo mismo que sobre factores de riesgo asociados con la enfermedad y formas de exposición. El primer registro de la enfermedad en Colombia, fue a finales de la década de los 60, donde se registra la enfermedad humana causada por el serovar *Icterohaemorrhagiae* con 4,28% de humanos positivos. El único brote epidémico documentado en el país se inicia en agosto de 1995, en el Departamento de Atlántico, con un total de 47 casos confirmados y 284 casos sospechosos, con una letalidad del 17%

entre los casos confirmados. Se aisló *Leptospira* de las serovariedades *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Canicola* (Datos del Departamento Administrativo de Salud de Barranquilla, 1996). En el estudio realizado en la región de Urabá (34) se mencionan la prevalencia de un 12.5% y en otros estudios realizados en Colombia, la región Antioqueña de producción lechera se encontraron que el 22,4% de los operarios tenían títulos para *Leptospira*, 3,9% hasta 14,3% en trabajadores de explotaciones porcinas de Manizales, 11% en un grupo de trabajadores de carnicerías y arroceras en los departamentos de Córdoba y Sucre, y prevalencias de anticuerpos de 23,3% en la ciudad de Cali (35).

### **Tecnología del Dispositivo de Diagnóstico**

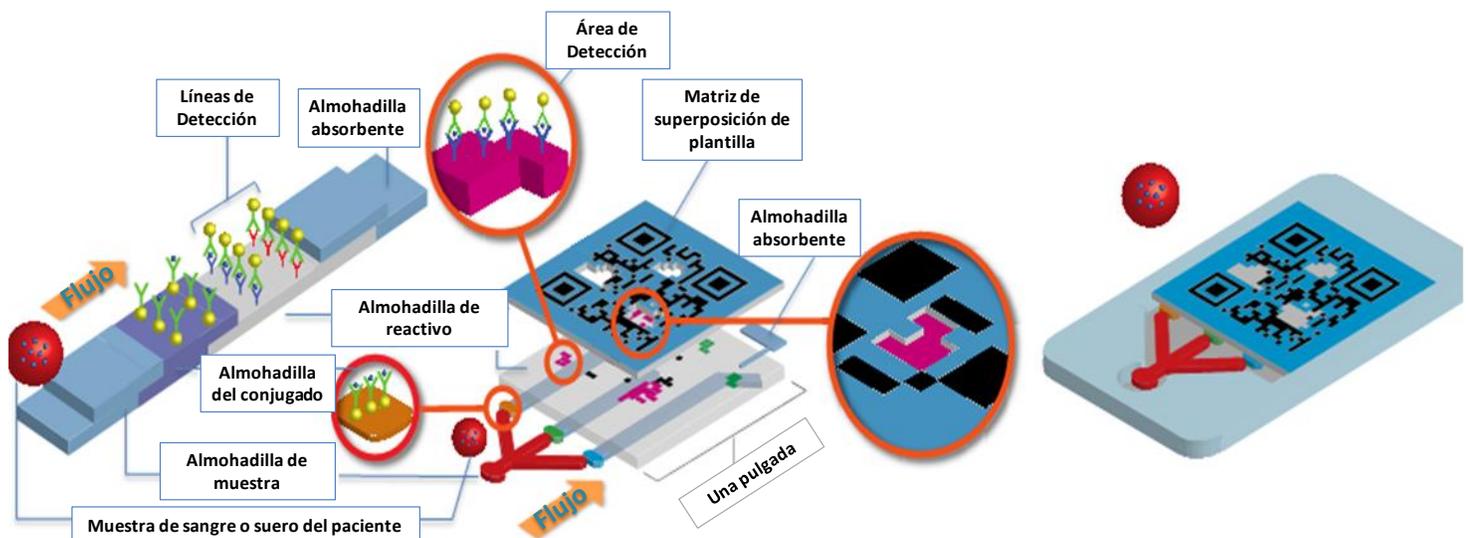
Proponemos un nuevo diseño o dispositivo de diagnóstico, incluyendo la respuesta rápida (QR-code) que consiste en un código de barra de dos dimensiones con una matriz o código de lectura óptico que permite el uso de la telefonía celular para captar la información digital y comunicarla en tiempo real traduciéndola en forma de texto. Conjuntamente proponemos nuevos métodos químicos de acoplamiento de antígenos y anticuerpos a las micropartículas de oro (nanopartículas), que se visualizan por contener quantum-dots de color rojo que aumentan la sensibilidad y amplían la capacidad de dichas partículas en métodos diagnóstico. Como son visualmente detectables, la unión antígeno-anticuerpo las inmoviliza en una membrana plana para dar como resultado una banda positiva que corresponde a la detección de la molécula de interés. Por último, proponemos desarrollar un ensayo múltiplex de flujo lateral en una sola corrida de la muestra (sangre, suero o plasma). Siendo esta propuesta, un conjunto de metodologías innovadoras, que consiste en la elaboración de un dispositivo que será legible automáticamente (teléfono celular), lo que representa un diagnóstico con capacidad integrada para realizar epidemiología en tiempo real utilizando las tecnologías de telefonía móvil y de posicionamiento geográfico. Proponemos reunir a un equipo interdisciplinario de científicos, ingenieros y médicos que puede entender la biología, la respuesta inmune a agentes infecciosos, la fisicoquímica de los métodos de detección, los métodos de fabricación necesario, etc, todo ello para producir nuevos dispositivos de diagnóstico del dengue.

Tradicional las pruebas de flujo lateral utilizan la acción capilar dentro de una membrana porosa que crea una fuerza motriz para impulsar conjugados de muestra y reactivos (antígenos / anticuerpos) a lo largo de un canal de papel. En las imágenes a continuación se muestra la detección de la proteína no estructural-1 (NS-1) del dengue que circula en la sangre del paciente (uno de los objetivos de este proyecto). La almohadilla de conjugado contiene el conjugado de detección, que será una nanopartícula de oro a la que se unen anticuerpos contra los cuatro serotipos del dengue, lo cual permite la captura de los antígenos virales (proteína NS1). La solución que contiene estas partículas es entonces conducida a través del soporte poroso en la almohadilla absorbente. El progreso de la detección de los complejos ligando conjugado se detiene en la línea de detección de unión del ligando. Cuando la detección de complejos con ligando se acumulan en una sola línea, se hacen visibles. La línea de control es un anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona con un control positivo, esto con el fin de confirmar que la prueba fue técnicamente exitosa.



**Figura 7.** Comparación de una tira de prueba estándar (izquierda) con la técnica propuesta QR código de diagnóstico rápido para la epidemiología de respuesta (a la derecha). Se debe tener en cuenta que las almohadillas de la en la técnica propuesta está multiplexada, dando lugar a cuatro almohadillas diferentes de detección de conjugados. Las líneas de detección en la tira de prueba estándar se sustituyen por los patrones de detección de lectura mecánica en el QR código de diagnóstico.

La tecnología la matriz de diagnóstico multiplex, MDM-AEDES, presenta las siguientes ventajas: detección simultánea de múltiples patógenos; optimización química de acoplamiento para permitir la máxima sensibilidad y especificidad; presentación de los datos del ensayo en un código QR, que es legible por máquina con cámara de un teléfono móvil común para la exactitud de los informes de datos y la confidencialidad del paciente; la interfaz de una aplicación para teléfonos nuevos (App) para la interpretación del diagnóstico, presentación, almacenamiento y transmisión de datos con localización geográfica GPS para los sistemas de información geográfica (SIG) MDM-AEDES y cartografía geográfica de la epidemiología en tiempo real que dirige las respuestas de salud pública.



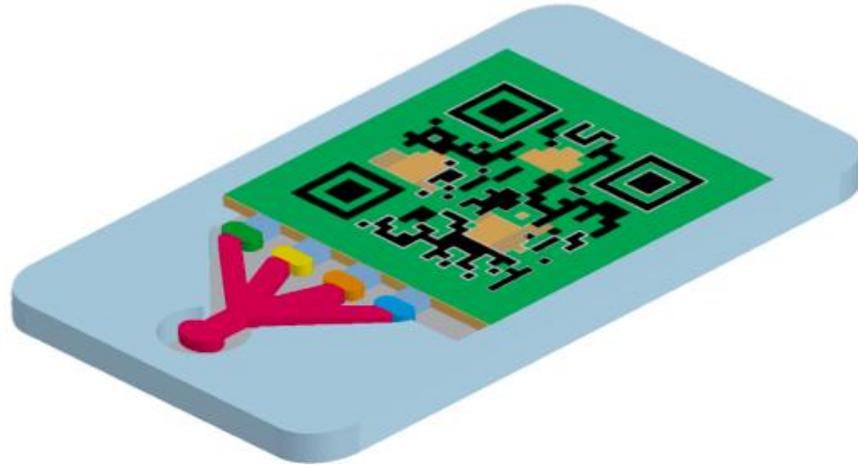


Figura 9. Matriz de diagnóstico multiplex ensamblado

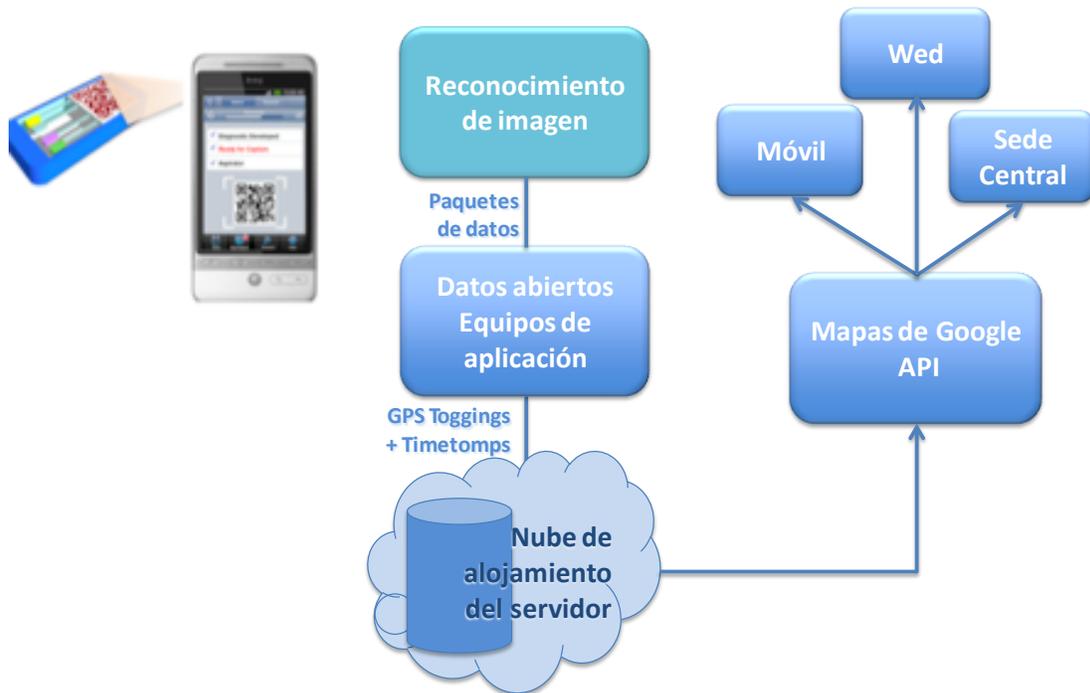


Figura 10. arquitectura del sistema para la epidemiología de respuesta utilizando los datos recopilados empleando códigos legibles por máquina, como QR. Una imagen de matriz de diagnóstico rápido se registra en el teléfono, sin encriptar, y se transmite a un conjunto base androides-ODK, un conjunto de herramientas . Los datos se asignan a continuación, y pueden estar disponibles en el hospital o centros de vigilancia epidemiológica en tiempo real.

## **8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA**

El trabajo descrito en esta propuesta es importante debido a que en la actualidad no existe una prueba rápida de diagnóstico para detectar patógenos emergentes, como lo son los cuatro tipos de virus del dengue. Pero la tecnología necesaria para realizarla si lo está establecida en los laboratorios y se puede aplicar. La propuesta puede: lograr la atención médica apropiada para poder minimizar los efectos de las enfermedades, alertar a los funcionarios de salud pública a tomar medidas para minimizar la propagación del agente patógeno, y comunicar en tiempo real los casos índices en las enfermedades epidémicas usando metodologías y tecnologías de punta. Las pruebas rápidas pueden proteger a los habitantes y viajeros, ayudando a prevenir la propagación de patógenos como el dengue. La propuesta también tiene importancia por proporcionar nuevos reactivos como proteínas virales recombinantes y anticuerpos monoclonales para la comunidad científica Colombiana. Los anticuerpos específicos de cada serotipo del virus del dengue serán elaborados por la inmunización en ratones con secuencias proteicas derivadas de la información genómica de los virus que circulan en Colombia. La importancia de la detección de los serotipos es que las inmunoglobulinas son factores de riesgo para la forma severa de la fiebre del dengue y por lo tanto el conocimiento del serotipo circulante es de importancia clínica. El dengue hemorrágico se produce en presencia de IgG proveniente de infecciones previas, y que no puede neutralizar la infección por el nuevo serotipo causante de la enfermedad en transcurso (7). Tal es el caso de una infección secundaria por dos serotipos diferentes y en forma consecutiva. Las complicaciones adicionales de tener IgG en circulación es que el virus es ahora capaz de infectar a través de la opsonización través de los receptores Fc se encuentra en muchas células inmunes sensibles. En el caso de una entrada FcR, la modulación inmune y la respuesta inmune a favor de cambiar la producción de citoquinas inflamatorias, que afectan en última instancia de la barrera endotelial y el aumento de la extravasación y la fuga de plasma presente en la condición de la fiebre hemorrágica. Por lo tanto, la introducción de un nuevo serotipo de dengue en una región podría tener consecuencias clínicas con posible aumento en la severidad del dengue hacia dengue hemorrágico.

## **9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O ÁREA TERRITORIAL BENEFICIADA**

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos, de rápida propagación en áreas tropicales y subtropicales, más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico. Su agente etiológico, el virus Dengue es un arbovirus transmitido por el *Aedes aegypti* con cuatro serotipos, todos capaces de producir infección y enfermedad (55,57). En el 2010, se presentó el mayor brote de dengue en América con 1.8 millones de casos notificados (44.656 de estos graves), de los cuales el 65% se concentraron en el cono sur; durante este año, 1.167 personas fallecieron por complicaciones de la enfermedad<sup>8</sup>. En Colombia cerca de 25 millones de personas están en riesgo de contagiarse, siendo una de las patologías infecciosas de mayor carga social y económica en el país(56). Durante el 2010, un año epidémico, se reportó al Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud 157.152 casos de Dengue, de los cuales, 9.482 fueron considerados casos severos de la enfermedad, con 217 muertes atribuibles a ella; como resultado la letalidad (2.28%) aumentó 7,5 veces respecto al año anterior, superando el índice máximo considerado para esta enfermedad (2%). Los casos fatales se presentaron en la mayoría de los

departamentos del país indicando alto nivel de transmisión en diferentes regiones y problemas en la calidad del manejo clínico de los pacientes con Dengue (56).

La carga de la enfermedad en las áreas endémicas es muy elevada, sobrepasando otras enfermedades virales, como el virus del papiloma humano o el rotavirus. Sin considerar los gastos generados por las actividades de fumigación, se estima que los costos directos e indirectos generados por la enfermedad en América son 2.1 billones de dólares anuales, con una pérdida promedio de 72,277 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (58). La población beneficiada directamente estará en los 8 municipios donde se desarrollará este proyecto Cali, Bucaramanga, Medellín, Pereira, Yopal, Arauca, Villavicencio y Cúcuta.

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1. Pregunta de Investigación:**

#### **10.1.1. Fase I:**

¿El uso de una prueba múltiple que determine los cuatro serotipos de dengue y la respuesta inmune puede aumentar la precisión, sensibilidad y velocidad del diagnóstico del dengue, reduciendo eventualmente el costo de estos dispositivos?

#### **10.1.2. Fase II:**

¿La elaboración de una plataforma multiplex servirá para combinar factores de severidad presentes en el dengue al mismo tiempo que provea un diagnóstico diferencial?

### **10.2. Tiempo del estudio**

La elaboración del dispositivo de diagnóstico, junto con su validación se desarrollará durante tres años.

### **10.3. Espécimen de análisis**

Sueros humanos almacenados a -80°C.

### **10.4. Aspectos éticos**

El presente estudio se realizará en sueros almacenados de pacientes captados en el Proyecto de AEDES del grupo de Epidemiología Clínica, por lo tanto es un estudio con riesgo menor de acuerdo a la resolución 008430 de 1993. Sin embargo, en el momento de captación y toma de muestras se tomó consentimiento informado a los pacientes o a sus padres en el caso de los menores de 18 años, en el que se solicitó autorización para almacenar los sueros y emplearlos en estudios posteriores. (VER ANEXO 2)

### **10.5. Fase I**

Se propone desarrollar y probar que un diagnóstico versátil con la capacidad de identificar patógenos en forma directa e indirecta, es decir, para detectar directamente las proteínas virales del dengue (NS1), así como indirectamente para la captura de inmunoglobulinas (IgG / IgM) de dengue. El desarrollo de un diagnóstico de serotipo específico del virus del

dengue requiere de anticuerpos específicos para cada serotipo. Algunos de estos anticuerpos están disponibles de inmediato (MIT) para dengue 2, sin embargo, que requieren una caracterización de éstos para determinar las especificidades y afinidades de dichos anticuerpos. Otros anticuerpos dirigidos contra los serotipos 1, 3 y 4, se generarán en la instalación de Dana Farber Cancer anticuerpo monoclonal Instituto (Boston) como parte de la colaboración con MIT.

#### **10.5.1. La producción de anticuerpos monoclonales:**

Una de las metas de este proyecto es preparar un diagnóstico que pueda detectar y distinguir los cuatro serotipos de dengue virus que circulan en el país. El personal del Laboratorio del MIT estará comprometido a la transferencia de tecnología necesaria para que estas técnicas sean elaboradas en el laboratorio de las Universidad Industrial de Santander en Colombia, una vez que dicha metodología sea optimizada en MIT a través de este proyecto colaborativo. La producción del virus del dengue se realizará en el laboratorio de MIT, con colaboración de Colombia. Por lo tanto, la producción de proteína NS1 en el sobrenadante de cultivos infectados será utilizados como antígeno para producir los anticuerpos contra NS1. Para la obtención de proteína NS1 recombinante se producen seguir los enfoques descritos por Chung et al. (10), y para la preparación de anticuerpos específicos. Para ellos se utilizarán las proteínas provenientes de los genomas virales que actualmente circulan en Colombia y que han sido secuenciados en colaboración con MIT. Como ejemplo de aquellas pruebas para detectar anticuerpos contra dengue, las proteínas del envoltura (E) del dengue (VER ANEXO 1) se producirá en bacteria o baculovirus. La afinidades serán examinadas por ELISA utilizando proteína E específica como antígeno (9), y se realizarán estudios de sensibilidad por ELISA (10) y por BiaCore (11). Estas proteínas recombinantes son las que se utilizarán para capturar los anticuerpos humanos circulantes IgM and IgG específicos contra el virus de dengue.

#### **10.5.2. Producción de nanopartículas (NP):**

Las Nanopartículas de oro se sintetizan mediante una síntesis de normas que los rendimientos de monodispersas, partículas estables, con control sobre el tamaño de NP. En pocas palabras, HAuCl<sub>4</sub> se reduce con el ácido tánico y ácido cítrico, que se traduce en NP soluble en agua con un diámetro de ~ 7nm. Al ajustar las concentraciones de reactivos y proporciones relativas, el diámetro medio de 40 nm. Para la síntesis de NP (19), HAuCl<sub>4</sub> se reduce primero en agua, HAuCl<sub>4</sub> + CTAB + NaBH<sub>4</sub> → partículas de oro. A continuación, las partículas se precipitan: HAuCl<sub>4</sub> + CTAB + AgNO<sub>3</sub> + ácido ascórbico + semillas Au Au → NP. Por espectroscopia de absorción óptica (UV-VIS) determinará la concentración de partículas.

#### **10.5.3. Reacciones de superficie:**

Diferentes ligandos de superficie se utilizarán para recubrir las superficies de las NP incluyendo el anticuerpo de NS1 del virus de dengue. El laboratorio Hamad-Schifferli localizado en MIT ha comprobado conocimientos en esta área que serán utilizados en este objetivo (20). Modificación de la superficie química será probada por electroforesis en gel de agarosa y por absorbancia (17, 21, 23, 24)

## **10.6. Fase II**

Se propone construir y probar un diseño novedoso, llamado matriz de diagnóstico multiplex (MDM-AEDES). El MDM-AEDES utiliza los mismos principios de los test rápidos (Figura 1). Componentes MDM-AEDES se diseñarán según métodos publicados (26-28) en un programa de diseño computarizado (Autodesk, San Rafael CA).

Las pruebas de rendimiento se centrarán en: volúmenes de muestra y el caudal, especificidad, sensibilidad, reconocimiento de imágenes / lectura.

### **10.6.1. Reconocimiento de la imagen / lectura:**

Los resultados serán fotografiados por un teléfono celular y leer con el software de la plataforma Android. El procesamiento de imágenes y reconocimiento de las bandas de diagnóstico han sido ampliamente analizados y sencillos programas de telefonía celular han sido desarrollados por un número de investigadores en el pasado (29, 30). Para este proyecto, vamos a utilizar la imagen de la plataforma software de reconocimiento diseñado para leer un código QR que se completa con los resultados de diagnóstico. Este código de barras bidimensional que contiene de 8-bits de información binaria en un formato legible por máquina. Lectores de códigos QR y de trabajo a través del mismo método que el tradicional código de barras 1-D, pero tienen la capacidad para codificar mucha más información como los resultados de la prueba, el lugar para enviar los resultados, y el número de la muestra. Los códigos QR son robustos en el que se incluyen la orientación, la alineación y la corrección de errores integrados en el modelo para que el código se puede leer, aunque hasta un 30% de la estructura se destruye. El patrón elegido para el código impreso se ha desarrollado utilizando el software generador de código QR (EVERSTAH, Karlsruhe, Alemania) que se traduce caracteres alfanuméricos en la matriz QR. El reconocimiento de imágenes para poder probar el software ImageJ (National Institute of Health) para medir la intensidad de las bandas.

## **11. PRODUCTOS**

Esperamos generar los componentes necesarios para construir y probar el prototipo diagnóstico, incluyendo la producción de anticuerpos de alta afinidad y específicos para el virus del dengue 1, 2, 3 y 4.

La producción de proteínas NS1 es una técnica estándar en el laboratorio, como es su purificación por inmutofinidad.

El logro de la especificidad en el serotipo específico de cada dengue NS1 puede ser un reto en la producción de anticuerpos específicos, sin embargo, anticipamos que los anticuerpos con la secuencia de aminoácidos es suficientemente diferente para lograr anticuerpos distingos y específicos.

El equipo de trabajo es multidisciplinario y cuenta con la experiencia y la experiencia necesaria para completar este proyecto, es una colaboración en M.I.T. entre los virólogos / biólogos moleculares con experiencia internacional del virus del dengue (Dr. Gehrke y Dr. Bosch), los investigadores con amplia experiencia en investigación clínica (Dr. Angel Villar y colegas). La misión de MIT es crear e implementar tecnologías que puedan transferirse a Colombia.

## 12. RESULTADOS

### Fortalecimiento Comunidad Científica:

Formación	Descripción	Personas	Beneficiario
Formación Estudiante postgrado	de Post-doctorado	1	Colombia/Red de conocimiento AEDES
Pasantías	Pasantías en MIT	3	Estudiante de Maestría/JI

### Apropiación Social del Conocimiento:

Publicación	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículos	Artículo en revista internacional indexada	2	Colombia -USA
Ponencia	Ponencia evento científico Nacional e internacional	2	Comunidad Científica

### Generación de nuevo Conocimiento:

Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Generación de nuevos conocimientos	Nueva Tecnología Diagnostico Dengue	1	Colombia/Red de conocimiento AEDES/USA

## 13. IMPACTOS

Impacto	Año	Descripción
En la población área territorial en términos epidemiológicos	2015	Nuevos métodos de diagnóstico de dengue

## 14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN

La ejecución del proyecto será en 8 municipios endémicos de Dengue en Colombia: Cali, Bucaramanga, Medellín, Pereira, Yopal, Arauca, Villavicencio y Cúcuta.

## 15. CRONOGRAMA POR FASES

N° Actividad	Actividad	Inicio	Final	Ejecución en
1	Preparación de los anticuerpos NS1. Conjugación de anticuerpos de ST2 y de IP-10 a las nanopartículas de oro	01/01	06/01	6 meses
2	Completar caracterización de anticuerpos monoclonales	07/01	09/01	3 meses
3	Preparación de conjugados de detección de las pruebas del prototipo	07/01	12/01	6 meses
4	Diseño multiplex prototipo.	07/01	12/01	6 meses
5	Comienzan las pruebas de viabilidad del dispositivo en el laboratorio	01/02	06/02	6 meses
6	Logística y pruebas de prototipos para ser utilizados con muestras de pacientes	07/02	10/02	4 meses
7	las pruebas de pacientes con dengue en Colombia	10/02	12/02	3 meses
8	análisis de datos y publicación de resultados	01/03	12/03	12 meses

## 16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

Un posible riesgo de este estudio, es que la aplicación de la Matriz de diagnóstico multiplex-AEDES (MDM-AEDES), no alcance la cobertura nacional de los servicios de salud.

## 17. BIBLIOGRAFÍA

1. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.* 2011;29(2):239-47.
2. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(7):518-28.
3. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3267-71.
4. Kroeger A, Nathan M, Hombach J. Dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(5):360-1.
5. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.* 1997;50(3-4):161-9.
6. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology.* 2010;7:361.

7. Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairot P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol.* 2007;24(4):227-36.
8. Fry S, Meyer M, Semple M, Simmons CP, Sekaran SD, Huang JX, McElnea C, Huang C-Y, Valks A, Young PR, Cooper M. The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1199.
9. Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, Diamond MS. Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Virol.* 2006;80(3):1340-51.
10. Chung KM, Diamond MS. Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J Med Virol.* 2008;80(3):547-56.
11. Leonard P, Hearty S, O'Kennedy R. Measuring protein-protein interactions using Biacore. *Methods Mol Biol.* 681:403-18.
12. 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(2):376-81.
13. Aubin-Tam M-E, Hwang W, Hamad-Schifferli K. Site-directed nanoparticle labeling of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Science.* 2009;106(11):4095-100.
14. Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century *Advances in Colloid and Interface Science.* 2007;134-135:167-74.
15. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-bio Interface. *Nature Materials.* 2009;8:543-57.
16. You CC, Miranda OR, Gider B, Ghosh PS, Kim IB, Erdogan B, Krovi SA, Bunz UH, Rotello VM. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(5):318-23.
17. Aveyard J, Nolan P, Wilson R. Improving the sensitivity of immunoassays by tuning gold nanoparticles to the tipping point. *Anal Chem.* 2008;80(15):6001-5.
18. Link S, El-Sayed MA. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry.* 2000;19(3):409-53.
19. Sau TK, Murphy CJ. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir.* 2004;20(15):6414-20.
20. Wijaya A, Hamad-Schifferli K. Ligand customization and DNA functionalization of gold nanorods via roundtrip phase transfer ligand exchange. *Langmuir.* 2008;24(18):9966-9.
21. Sapsford KE, Tyner KM, Dair BJ, Deschamps JR, Medintz IL. Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. *Analytical Chemistry.* 2011;83(12):4453-88.
22. Park S, Brown KA, Hamad-Schifferli K. Changes in oligonucleotide conformation on nanoparticle surfaces by modification with mercaptohexanol. *Nano Letters.* 2004;4(10):1925-9.
23. Park S, Hamad-Schifferli K. Evaluation of hydrodynamic size and zeta-potential of surface-modified Au nanoparticle-DNA conjugates via Ferguson analysis. *Journal of Physical Chemistry C.* 2008;112(20):7611-6.

24. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11(7):36-42.
25. Fenton EM, Mascarenas MR, Lopez GP, Sibbett SS. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009;1(1):124-9.
26. Hasenbank MS, Edwards T, Fu E, Garzon R, Kosar TF, Look M, Mashadi-Hosseini A, Yager P. Demonstration of multi-analyte patterning using piezoelectric inkjet printing of multiple layers. *Anal Chim Acta*. 2008;611(1):80-8.
27. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chem*. 82(1):3-10.
28. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal Chem*. 2009;81(16):7091-5.
29. Dell N. Towards a Point-of-Care Diagnostic System: Automated Analysis of Immunoassay Test Data on a Cell Phone. 5th ACM Workshop on Networked Systems for Developing Regions Bethesda, Maryland. 2011.
30. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, 3rd, Sindi H, Whitesides GM. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem*. 2008;80(10):3699-707.
31. Gomez-Marquez J, Hanamura M, inventors; Massachusetts Institute of Technology, assignee. Multiplexed Behavior Diagnostic. 2009.
32. Branco LM, Grove JN, Moses LM, Goba A, Fullah M, Momoh M, Schoepp RJ, Bausch DG, Garry RF. Shedding of soluble glycoprotein 1 detected during acute Lassa virus infection in human subjects. *Virology*. 2007;357(1):306.
33. Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Jan;9(1):111-21.
34. Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo BN, Arboleda-Naranjo M. [Leptospirosis in Uraba, Antioquia, Colombia: a seroepidemiological and risk factor survey in the urban population]. *Cad Saude Publica*. 2007 Sep;23(9):2094-102.
35. Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección con *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali, Colombia. *Biomédica (Bogotá)* 2006; 26:250-7.
36. Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):114-20. Epub 2008 Jan 28.
37. Houghton-Triviño N, Salgado DM, Rodríguez JA, Bosch I, Castellanos JE. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol*. 2010 Mar;91(Pt 3):697-706. Epub 2009 Nov 4.
38. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol*. 1999; 59: 335-40.
39. Ministerio de Protección Social. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de Dengue. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/Documents/Salud%20P%20C3%BAblica/Ola%20invernal/entomologia%20DENGUE.pdf>
40. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia Boletín de Vigilancia por Dengue en Colombia No. 48 Semana 52 de 2010. Disponible en: <http://190.27.195.165:8080/index.php?idcategoria=84140#>
41. Bancroft, TL (1906). On the aetiology of dengue fever *Aust. reed. Gaz.*, 25, 17. *Amer. J. trop. Med.*, 77, 171-197.

42. Chaturvedi U.C, Agarwal R., Elbishbishi E.A., Mustafa A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 28 (2000) 183-188
43. WHO Media Centre. Base de Datos N°117. Marzo 2009. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>.
44. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Washington, D.C. Publicación Científica 548, p 110. 1995.
45. Ministerio de Protección Social. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de Dengue. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/Documents/Salud%20P%C3%BAblica/Ola%20invernal/entomologia%20DENGUE.pdf>)
46. Shepard D S, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, and Dayan G H. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. Am. J. Trop. Med. Hyg., 84(2), 2011, pp. 200–207