

27
34

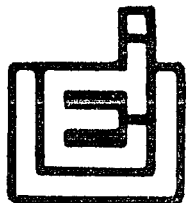


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE LOS SEROTIPOS DE VIRUS DE
DENGUE ASOCIADOS A CASOS CLINICOS POR LAS
PRUEBAS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION
Y NEUTRALIZACION EN PLACA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N
GUADALUPE ANGELICA LOPEZ SOTELO
ROBERTO VAZQUEZ CAMPUZANO



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Pags.
I.- Generalidades	1
1.- Historia	2
2.- Clasificación	9
3.- Características	11
4.- Distribución	13
5.- Epidemiología	13
6.- Caracteres clínicos	16
7.- Patogénesis	22
8.- Inmunología	24
9.- Inmunopatogénesis	27
10.- Diagnóstico	30
11.- Tratamiento	33
12.- Prevención y control	34
II.- Objetivos	36
III.- Material y Métodos	37
IV.- Resultados	49
V.- Discusión	59
VI.- Conclusiones	66
VII.- Apéndices	67
VIII.- Bibliografía	81

R E S U M E N

Se recibieron en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S.E.T.) en un período aproximado de 8 meses 2,500 muestras con diagnóstico clínico de Dengue, provenientes de diferentes centros Regionales de Salud de la República Mexicana, los cuales fueron procesados por el método de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), mostrando una amplia reactividad cruzada entre los serotipos de virus de Dengue, lo cual impedía la identificación del serotipo infectante.

Con el fin de establecer el serotipo causal de la enfermedad, el tipo de respuesta serológica y obtener información sobre la posible circulación de Dengue tipo 3, se seleccionaron de acuerdo a las posibilidades del laboratorio 30 muestras (28 pares y 2 muestras únicas) para probarse por el método de Neutralización en Placa, el cual fue previamente adaptado en botellas de cultivo celular y posteriormente en microplacas.

Analizando los resultados de ambas pruebas y utilizando criterios ya establecidos, se lograron identificar los serotipos infectantes, así como el tipo de respuesta serológica.

Así mismo se comprobó la mayor especificidad de la prueba de Neutralización comparada con la prueba de IHA, para diferenciar los serotipos de virus de Dengue.

No se encontraron anticuerpos contra virus de Dengue tipo 3, sugiriendo que no hay actividad de este serotipo.

Se observó la prevalencia de respuestas de tipo secundario, indicando la posibilidad de la presentación de la forma severa de la enfermedad en nuestro país (Dengue hemorrágico).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los serotipos de virus del Dengue asociados a casos clínicos son principalmente Dengue 1 y Dengue 4.

I.- GENERALIDADES

Los Arbovirus son un grupo heterogeneo de agentes virales reunidos en una clasificación por ciertas características básicas epidemiológicas. En un principio, cualquier virus clasificado como Arbovirus debe mantenerse en la naturaleza principalmente por un ciclo continuo de transmisión biológica (multiplicación y período de incubación extrínseco), por un vector artrópodo a un vertebrado, produciendo una viremia que es infecciosa a otro vector artrópodo disponible después de su alimentación con sangre. [26]

Los mayores vectores incluyen: mosquitos, pulgas y garrapatas, la infección del hombre no es esencial para el mantenimiento y diseminación de este grupo, por lo cual las enfermedades resultantes de este tipo de infecciones se consideran como zoonosis. [31]

Además del método principal de transmisión por artrópodos, algunos agentes bien establecidos, entre los que figura el virus de la Encefalitis Equina de Venezuela (EEV), se puede transmitir de vez en cuando sin la mediación de un artrópodo, a través de secreciones faríngeas u otras secreciones y, la transmisión puede ser ocasionalmente por medios mecánicos en lugar de biológicos.

La palabra Arbovirus se formó por la unión de las dos primeras letras de las palabras inglesas arthropod borne, es decir virus transmitidos por artrópodos.

Los Arbovirus merecen atención especial porque algunos de ellos producen epidemias graves en el hombre y sus animales domésticos; por ejemplo: Fiebre amarilla, Dengue, Encefalitis Equina (EE) de Venezuela, EE del Este, EE del Oeste, E. de San Luis, E. Japonesa B, Fiebre Hemorrágica de Crimea etc. [4]

Se puede afirmar que la distribución de los Arbovirus es universal, siendo las zonas tropicales en donde se ha encontrado el mayor número.

Debido a la gran importancia que ha adquirido el Dengue a nivel epidemiológico en el transcurso del tiempo, convirtiéndose en un serio problema de salud en nuestro país, éste trabajo se enfoca hacia esta virosis.

1.- HISTORIA

Por cerca de dos siglos, el Dengue fue clasificado junto con gripe o diarrea, como incidente menor en la adaptación a la vida tropical. No se había apreciado que desde los años cincuentas, los virus de Dengue han causado síndrome de shock, que se presenta con dramática velocidad, y que frecuentemente está complicado con hemorragia intestinal, seguida por la muerte.

El término "Dengue", fue introducido a la literatura médica inglesa, desde las Indias Españolas Occidentales, durante la epidemia de 1827 - 1828 en el Caribe, de una enfermedad exantemática con artralgia. Dengue, es el homónimo español para el Swahili "Ki denga pepo" (un repentino ataque parecido a un calambre, causado por un espíritu maligno).

Durante la mayor parte del siglo XIX, los exantemas causados por alfavirus y flavivirus fueron reportados indistintamente, como "Fiebre de Dengue", contribuyendo a la noción de que el Dengue era una enfermedad con pocas consecuencias clínicas.

El reconocimiento de la Fiebre Hemorrágica de Dengue (DHF) y el Dengue con Síndrome de Shock (DSS) tuvo que esperar una evidencia más rigurosa de la etiología viral por Dengue. Esta evidencia se presentó después de que el virus de Dengue fue adaptado a animales de laboratorio en los años cuarenta (tipos 1 y 2) y en los cincuentas (tipos 3 y 4). [25]

Aunque la fiebre de Dengue ha sido conocida como una entidad clínica en las Américas, por alrededor de 200 años, la información de la distribución --

precisa de los serotipos de Dengue sólo ha estado disponible a partir de las últimas tres décadas.

La introducción del virus del Dengue en el Caribe y áreas adyacentes con resultados epidémicos ha estado ocurriendo con frecuencia variable desde por lo menos 1826. Por lo tanto, cuando el actual Dengue 1 apareció habiendo sido posiblemente importado de Africa, es un testimonio epidemiológico similar a otros que han ocurrido muchas veces en el pasado.

En el Caribe el virus de Dengue serotipo 2 fue el primero en aislarse en Trinidad en 1952 y el Dengue tipo 3 en Puerto Rico durante la epidemia de 1963 1964. [40]

La introducción de una nueva cepa de Dengue en el Caribe con su subsecuente distribución epidémica no es un evento sin precedentes y fue predecible cuando se contempló en un contexto histórico.

El Dengue ha sido responsable de muchas epidemias desde 1827 a 1953. Estudios serológicos confirmaron la presencia del virus en Panamá, Guyana, las islas del Caribe, Florida y Texas, de lo cual se puede inducir que el virus de Dengue puede ser endémico en la parte norte de América del Sur. El Dengue tipo 2 causó una epidemia en Panamá de 1941 a 1942 y se obtuvo evidencia de que el Dengue tipo 1 había estado presente en años anteriores.

Epidemias causadas por Dengue tipo 3 aparecieron en el Caribe en 1963. En 1968, el Dengue tipo 2 se diseminó y estuvo asociado con Dengue tipo 3. [40]

Como consecuencia aparente de una epidemia en algunas islas del Caribe y los países de Centro América, el virus de Dengue se reintrodujo a nuestro país en diciembre de 1978 a través de la frontera Sureste. [56]

Acto seguido afectó las costas de Chiapas, principalmente las regiones - por abajo de 1000 metros sobre el nivel del mar.

Para principios de 1979 se encontró el virus afectando la zona de Tonalá y Arriaga, llegando incluso a la zona del Istmo principalmente Ixtepec y Salina Cruz. En vez de propagarse por el litoral del Pacífico, remonta hacia la parte central del Istmo y llega a las costas del Golfo de México.

Además de esta corriente principal, hubo una introducción del virus de Dengue a través de Belice y Quintana Roo, afectando Chetumal, Cancún, Yucatán y parte de Campeche.

En el mes de junio de 1981 se registraron casos de Dengue en la zona de Pinotepa Nacional. A partir de ahí se diseminó a algunas ciudades de Guerrero para llegar a Acapulco durante la primera mitad de 1981, posteriormente hubo informes de la virosis en la parte sur de Sinaloa. [6, 56] Figura # 1.

La distribución de Dengue en nuestro país fue favorecida por los movimientos migratorios desde América Central, y en los siguientes seis años la transmisión se diseminó en la mayoría de los estados del país aislándose en las diferentes epidemias los serotipos 1, 2 y 4. [50, 62]

Desde entonces, la enfermedad ha ido avanzando, afectando cada vez una mayor parte de las 32 entidades federativas en que se encuentra dividido el país.

A partir de la información obtenida en los registros del sistema de vigilancia epidemiológica se observa cada vez mayor frecuencia el reporte de brotes de la enfermedad en localidades situadas por arriba de los 1,200 metros sobre el nivel del mar.

En 1984 se estudió un brote de Dengue causado por el virus tipo 4 en el estado de Yucatán. Se reportaron 5,486 casos clínicos, de los cuales se estudiaron 538 pacientes, de estos 200 fueron positivos a la infección por virus de Dengue, 131 fueron negativos. Hubieron 10 casos de enfermedad hemorrágica, 3 de los cuales fueron confirmados como casos de Dengue. Cuatro de estos pacientes fallecieron, y los seis restantes se recuperaron. Los cuatro casos fatales fueron mujeres, con edades de 8, 9, 19 y 37 años. [8, 9, 32]

Se han realizado estudios para determinar la prevalencia de anticuerpos contra virus de Dengue en la población de diversos estados, determinando así el riesgo potencial de infecciones secundarias. Cuadro # 1.

Hasta 1986 se han logrado los aislamientos de los serotipos 1, 2 y 4 en diversos estados de la República Mexicana. Cuadro # 2.

Entre éstos estados tenemos: Sonora (Dengue 1), Nayarit (Dengue 1 y 4), Jalisco (Dengue 1, 2 y 4), Colima (Dengue 1 y 4), Michoacán (Dengue 1), Guerrero (Dengue 1 y 2), Oaxaca (Dengue 1, 2 y 4), Nuevo León (Dengue 1 y 4), Tamaulipas (Dengue 1 y 4), Veracruz (Dengue 1 y 4), Tabasco (Dengue 4), Hidalgo (Dengue 4), Puebla (Dengue 1 y 2), Morelos (Dengue 1, 2 y 4), Yucatán (Dengue 1 y 4) y Quintana Roo (Dengue 1). Figura # 2

CUADRO # 1

ENTIDADES CUYA SEROLOGIA INVESTIGADA POR IHA ES DE TIPO
SECUNDARIO PARA LOS VIRUS DE DENGUE. MEXICO

1983 - 1986

ENTIDAD	A Ñ O S			
	1983	1984	1985	1986
AREA NORTE				
SONORA			+	+
COAHUILA			+	
NVO. LEON			+	+
AREA DEL PACIFICO				
SINALOA	+		+	
NAYARIT		+	+	+
JALISCO		+	+	+
COLIMA		+	+	+
MICHOACAN	+	+	+	+
GUERRERO	+	+	+	*
OAXACA			+	+
CHIAPAS	+	+	+	+
AREA DEL GOLFO				
TAMAULIPAS	+	+	+	+
VERACRUZ	+	+	+	+
TABASCO			+	+
YUCATAN		+	+	
AREA CENTRO				
MORELOS	+			+
PUEBLA	+	+	+	+
S.L.P.	+	+	+	+
HIDALGO				+
MEXICO				+

* no envió muestras

CUADRO # 2 SEROTIPOS DE VIRUS DEL DENGUE AISLADOS DE CASOS

AGUDOS MEXICO 1982- 1986

ENTIDAD	A Ñ O S				
	1982	1983	1984	1985	1986
COSTA DEL PACIFICO					
SONORA		1	1		
NAYARIT			1	1	1, 4
JALISCO			1, 2	1, 4	1
COLIMA			1	1	4
MICHOACAN					1
GUERRERO		2	1		
OAXACA		4	1	1	1, 2, 4
COSTA DEL GOLFO					
NVO. LEON			1	1	1, 4
TAMAULIPAS					1, 4
VERACRUZ	1				1, 4
TABASCO				4	
YUCATAN			1, 4		
QUINTANA ROO			1		
ZONA CENTRAL					
PUEBLA		1		1	1, 2
MORELOS			1		1, 2, 4
HIDALGO					4

PROPORCIONO: DRA. M.L. ZARATE, INSTITUTO DE SALUBRIDAD Y ENFERMEDADES TROPICALES.

Existe en la actualidad evidencia de que el patrón epidemiológico de Dengue está cambiando en México. La situación endemo-epidémica que muestran algunas localidades en el país, la circulación simultánea de tres serotipos diferentes, su amplia distribución geográfica y la presencia de nuevos vectores son factores a considerar para hacer un análisis global adecuado de la transmisión de la enfermedad.

2.- CLASIFICACION.

Los Arbovirus inicialmente se clasificaron siguiendo criterios ecológicos y biológicos que incluían circunstancias de aislamiento, relación antigénica con un miembro establecido, efecto en animales de laboratorio y cultivo de tejidos y reducción de la infectividad con éter o desoxicolato de sodio.

Los flavivirus fueron originalmente clasificados en un grupo (grupo B de los Arbovirus) por Casals y Brown, en base a las reacciones cruzadas en la prueba de inhibición de la hemaglutinación. [26]

Análisis antigénicos mostraron que el serogrupo podía ser dividido en complejos o subgrupos, con los miembros más estrechamente relacionados.

Posteriormente, los Flavivirus formaron un subgénero de la familia Togaviridae. Actualmente, el virus de Dengue se encuentra clasificado dentro de la familia Flaviviridae, género Flavivirus. Cuadro # 3.

Por medio de las pruebas serológicas de inhibición de la hemaglutinación, Fijación de Complemento y Neutralización, se han clasificado estos virus en una serie de grupos antigénicos y por medio de la utilización de anticuerpos monoclonales de origen humano o primate, ha sido posible identificar cuatro tipos distintos de virus del Dengue llamados convencionalmente 1, 2, 3 y 4. [42, 49]

La comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas estructurales C, M y E de Dengue 1, 2 y 4 ha revelado un alto grado de similitud entre ellas (60 - 73 %). Grandes regiones en la proteína E son homólogas entre los

CUADRO # 3

C L A S I F I C A C I O N

FAMILIA: FLAVIVIRIDAE

GENERO: FLAVIVIRUS

SUBGRUPOS:

SUBGRUPO 1.- Enfermedad del Bosque de Kyasanur, Fiebra Hemorrágica de Omsk,
(12 VIRUS) Encefalitis Central Europea, Powassan, Encefalitis Rusa de Primavera - Verano.

SUBGRUPO 2.- Río Bravo, Murciélago de Dakar, Murciélago de Entebbe, Murciélago de Bukalasa, Isla Carey.

SUBGRUPO 3.- Modoc, Jutiapa, Sal Vieja, San Perlita.
(5 VIRUS)

SUBGRUPO 4.- Encefalitis Japonesa, Encefalitis del Valle Murray, Encefalitis de San Luis, Nilo Occidental, Rocío, Kunjin.

SUBGRUPO 5.- Meningo Encefaliti de Israel, Ntaya, Tembusu, Bagaza.
(4 VIRUS)

SUBGRUPO 6.- Banzi, Uganda, Bouboui.
(4 VIRUS)

SUBGRUPO 7.- Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 y Dengue 4.
(4 VIRUS)

SUBGRUPO 8.- Sepik.
(1 VIRUS)

13 virus no muestran relación con los Flavivirus, reaccionan sólo a niveles marginales y pueden o no ser colocados en un subgrupo: Fiebre Amarilla, Aroa, etc.

serotipos de Dengue.

Las secuencias de aminoácidos únicas para cada serotipo están presentes en la mitad de la proteína E donde la estructura secundaria y los dominios hidrofóbicos son predominantes. [18, 55]

En general, los virus que tienen relaciones inmunológicas demostrables por cualquiera de éstas pruebas, poseen constituyentes en común, y por lo tanto pertenecen al mismo grupo. Dentro del mismo grupo, los que muestran relación más íntima forman un subgrupo o complejos. [23]

3.- CARACTERISTICAS.

a) PROPIEDADES FISICAS.

Los Flavivirus, pequeños virus icosaédricos de 20 a 40 nm de diámetro -- presentan envoltura de lípidos esenciales.

Tienen un genoma RNA filamento único, con peso molecular de 4 millones de daltons, de aproximadamente 11,000 nucleótidos y con polaridad positiva.

En general, se inactivan fácilmente con el calor; su estabilidad aumenta si se agrega suero normal o albúmina a la suspensión. A - 70°C conservan su infectividad durante años e indefinidamente por liofilización. Son sensibles a la acción de la luz, las radiaciones X y las ultravioleta que los destruyen fácilmente, poseen un coeficiente de sedimentación entre 17 S y 218 S dependiendo de la célula de origen. La densidad del virión determinada por gr -- diente de centrifugación es de 1.22 a 1.24 g/cm³.

Las partículas de los Flavivirus contienen tres proteínas estructurales: una proteína mayor de envoltura glicosilada (E, formalmente designada como V3) de peso molecular aproximado de 53,000, una proteína menor de envoltura no glicosilada (M o V1) de peso molecular de 8,700 y una proteína de nucleocápside no glicosilada (C o V2) de peso molecular de 13,500.

La glicosilación de la proteína E es variable y aparentemente no esencial para el ensamble de los Flavivirus.

La proteína E está expuesta sobre la superficie del virión y contiene la mayoría de los antígenos involucrados en la reactividad inmunológica. Nueve - proteínas intracelulares virus específicas no viriónicas han sido descritas. Las funciones de las proteínas no viriónicas no están bien definidas.

La composición de fosfolípidos de los Flavivirus refleja la célula de la cual deriva. [4, 23, 41]

b) PROPIEDADES QUÍMICAS.

Como resultado de la presencia de una envoltura lipídica éstos virus son altamente susceptibles a la inactivación con desoxicolato de sodio, éter etílico, cloroformo, urea, aldehídos, lipasas, etc. La formalina y la beta-propiolactona los inactivan dejando intacta su capacidad antigénica, de donde se deriva que la cubierta de lípidos se encuentra asociada a la infectividad.

La envoltura soporta los determinantes antigénicos específicos para el serotipo de virus de Dengue, para el subgrupo de Dengue y para el grupo de Flavivirus.

El pH es un factor crítico, el óptimo para los diferentes grupos oscila entre 6.0 - 7.0. [4, 11]

c) PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

El ensamble y maduración de los viriones puede ocurrir a través de procesos de condensación de vacuolas intracitoplasmáticas.

Las partículas maduras dentro de las vacuolas, son liberadas extracelularmente por fusión con la membrana plasmática (pinocitosis reversa) o en células severamente dañadas por lisis de la membrana plasmática.

Son capaces de multiplicarse en un artrópodo hematófago vector, que comúnmente es el mosquito Aedes aegypti. Los hospederos vertebrados naturales - incluyen una gran variedad de animales domésticos y silvestres de varias especies (aves, mamíferos y probablemente reptiles), el hombre es generalmente un hospedero accidental. [4, 23]

En el laboratorio se replican en monos (Macacus rhesus), embrión de pollo y ratones lactantes, así como en cultivos celulares como son los derivados de células de mosquito (TFA-284) [11], y líneas establecidas: LLC-MK₂ (continuas de riñón de mono rhesus), Vero (continuas de riñón de mono verde), HeLa (derivadas de células cancerosas de cérvis), etc.

4.- DISTRIBUCION.

Con tal cantidad de mecanismos diferentes para lograr su supervivencia -- biológica, la adaptación ha de considerarse como proceso continuo, no sólo en tiempo sino en relación a la distribución geográfica, diseminación, localización, limitación, desplazamiento y eliminación. Esta diseminación mundial -- hace imposible separar estrictamente las enfermedades tropicales de otras virsis transmitidas por artrópodos.

La distribución del virus de Dengue para las Américas se muestra en la figura # 3.

5.- EPIDEMIOLOGIA

Las características epidemiológicas básicas son la transmisión activa por vectores artrópodos y su amplia gama patogénica que le permite infectar espe -

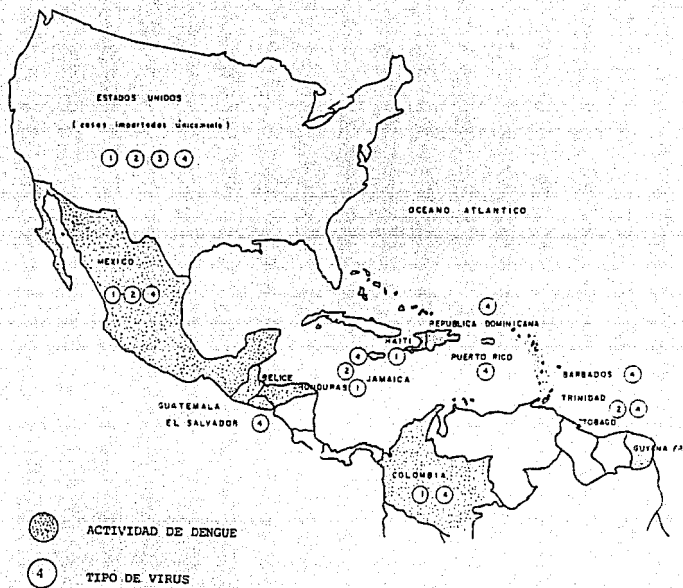


FIGURA # 3

DENGUE EN LAS AMERICAS

cies que pertenecen a varias clases: arácnidos, insectos, aves y mamíferos.

Debido al vector implicado en el ciclo vital del virus del Dengue, hace suponer que la cadena de infección depende de un hospedero virémico, un vector hematófago y un hospedero susceptible.

Los vertebrados infectados que no mueren, se recuperan rápidamente, eliminan el virus y desarrollan inmunidad duradera contra la infección subsecuente. Por otro lado, los artrópodos infectados pueden portar el virus toda la vida. Así el virus se mantiene en la naturaleza alternando entre hospederos vertebrados e invertebrados. El hombre se puede infectar tangencialmente cuando invade el ciclo ecológico natural y es picado por un mosquito. [26, 43]

En los climas tropicales o subtropicales, donde los mosquitos y las garrapatas coexisten con las aves y los mamíferos silvestres, el virus de Dengue persiste indefinidamente es decir, es endémico y requiere sólo una fuente continua de vertebrados jóvenes susceptibles y una suficiente densidad de población de artrópodos para asegurar su sobrevivencia.

Sin embargo, la transmisión continua se interrumpe anual o periódicamente por la baja temperatura del invierno en las zonas templadas, cuando los vectores están inactivos y las estaciones secas prolongadas en las regiones tropicales.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la sobrevivencia del virus en períodos adversos y su reaparición cuando las condiciones son favorables: persistencia del virus en forma latente en los artrópodos vectores, infecciones crónicas recurrentes en hospederos vertebrados que servirán como fuentes del virus y la reintroducción de virus en zonas templadas cada primavera por las aves migratorias. El mecanismo más verosímil en las zonas templadas es probablemente la infección de mamíferos hibernantes (murciélagos) y reptiles.

Se ha demostrado que la viremia puede reaparecer cuando cesa la hibernación varios meses después. Por otro lado, la sobrevivencia indefinida de los virus de Dengue, transmitidos por mosquitos, está asegurada por el pase transovárico. [26]

El vector pertenece al orden Díptera, familia Culicidae subgénero Stegomyia, género y especie Aedes aegypti, el cual es un mosquito predominantemente

doméstico, de color obscuro. Es un mosquito tropical y subtropical, sus criaderos se limitan básicamente a depósitos artificiales de agua, se reproducen preferentemente dentro de los neumáticos, botellas, canales de techos, latas, floreros y casi cualquier objeto de manufactura humana que pueda retener agua y no está rodeado de tierra, en donde proliferan fácilmente alcanzando niveles de densidad elevados. [21]

Aunque Aedes aegypti es considerado como el transmisor más común de Dengue, se han señalado a otras especies capaces de transmitir la infección tales como: Aedes albopictus, Aedes scutellaris, Aedes albimanus, Aedes hebrideus y Aedes polynesiensis. [26, 61]

Aedes aegypti es el vector más eficiente debido a su hábitat doméstico, puede transmitir el Dengue después de un período de incubación de 8 a 10 días, durante los cuales el virus se multiplica en sus glándulas salivales.

6.- CARACTERES CLINICOS.

Los virus de Dengue producen un espectro de enfermedades en los humanos - que van desde la fiebre indiferenciada, al Síndrome de fiebre de Dengue, hasta la Fiebre hemorrágica de Dengue con y sin shock.

a) FIEBRE DE DENGUE.

El período de incubación oscila entre 2.5 y 15 días, siendo como término-medio de 5 a 8 días. La enfermedad comienza por lo general, con un escalofrío repentino, cefalalgias, artralgias, mialgias que afectan principalmente los músculos del cuello y tórax, que impiden la libertad de movimiento, dolores que se localizan en el bulbo ocular y fiebre alta (39 - 40°C).

Figura # 4

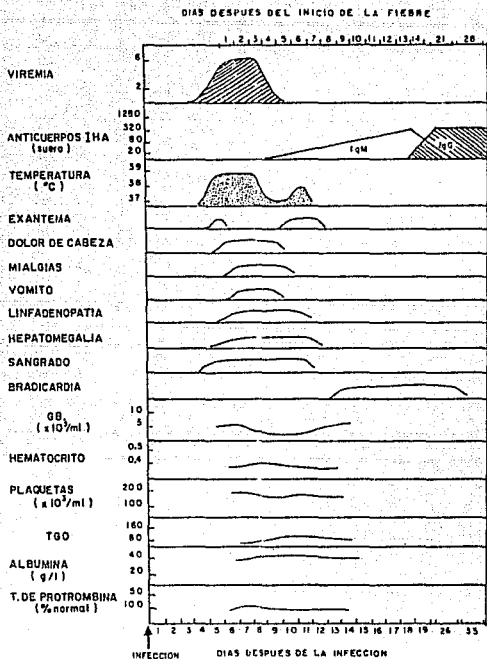


FIGURA # 4

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO
DEL SINDROME FEBRIL POR DENGUE

En muchos enfermos aparece una erupción de tipo eritema. Pasados 1 a 4 días aparece la remisión. La temperatura desciende surgiendo una sudoración profusa. Después se desarrolla un segundo acceso, que se caracteriza por otra elevación de la temperatura y manifestaciones de los síntomas principales del primer ataque. En el cuerpo aparece una erupción maculo-papular o escarlatiniforme que desaparece a los 3 - 4 días como mínimo. La prolongación total del curso de la enfermedad es de 4 a 5 días.

En niños pequeños, la infección por Dengue generalmente no es reconocida. Sin embargo se acepta que algunas infecciones de Dengue son completamente inaparentes. Esta es caracterizada más comúnmente por enrojecimiento faríngeo, rinitis leve, tos y síntomas gastrointestinales ligeros, y se diagnostica como faringitis, influenza o infección del tracto respiratorio alto.

b) FIEBRE HEMORRAGICA DE DENGUE (DHF).

La enfermedad comienza comúnmente con un aumento repentino de la temperatura, el cual es acompañado por rubor facial y otros síntomas constitucionales no específicos tales como anorexia, vómito, dolores musculares y de cabeza. Es común el malestar epigástrico, sensibilidad en el margen costal derecho y dolor abdominal generalizado. La temperatura es característicamente alta y se mantiene así, persistiendo durante 2 a 7 días, para caer después a un nivel normal o subnormal. A veces la temperatura puede llegar a 40 - 41°C y puede haber convulsiones febriles.

El fenómeno hemorrágico más común es la hemorragia en piel, prueba de torniquete positiva y sangrado en los sitios de venopuntura, presentes en la mayoría de los casos.

Pueden verse pequeñas Petequias diseminadas en extremidades, axilas, cara y paladar durante la etapa febril temprana. Una erupción petequeial confluyente con áreas características redondeadas de piel normal, se observa en la convalescencia después de que la temperatura ha sido normal por dos o tres días.

También puede presentarse epistaxis, sangrado de encías y hemorragias --
gastrointestinales.

El hígado es usualmente palpable en la fase febril. Su tamaño varía de-
dos a cuatro centímetros sobre el margen costal.

Los signos clínicos y los síntomas descritos están acompañados por anorma-
lidades de laboratorio que evolucionan característicamente. La trombocitopa-
nia y hemoconcentración son descubrimientos constantes; una cuenta plaquetaria
menor a 100, 000/mm³ se observa frecuentemente entre el tercero y el octavo -
día.

Otros hallazgos comunes son: hipoalbuminemia, hipoproteinemia, hiponatre-
mia, transaminasas séricas y nitrógeno ureico elevados.

La cuenta de glóbulos blancos es variable, desde la leucopenia hasta la -
leucocitosis moderada. Es común encontrar linfocitosis con leucocitos atípi-
cos.

Muchos pacientes tienen tiempos de protrombina y tiempos parciales de --
tromboplastina prolongados, con reducción de los niveles en suero de los facto-
res II, V, VII, IX y XII. Una disminución de los niveles de fibrinógeno está
relacionada con la severidad de la enfermedad. Figura # 5

c) DENGUE CON SINDROME DE SHOCK (DSS).

En los casos severos, después de una fiebre de pocos días de duración, la
condición del paciente repentinamente se deteriora. Poco después de una dis-
minución de la temperatura del tercero al séptimo día de la enfermedad, hay -
signos de fallas circulatorias: la piel se torna fría, manchada y congestiona-
da, frecuentemente se observa cianosis y el pulso es rápido. Sin embargo -
algunos pacientes parecen letárgicos, están intranquilos y entonces rápidamen-
te caen en estado crítico de shock. El dolor abdominal es frecuente poco -
antes del inicio del shock.

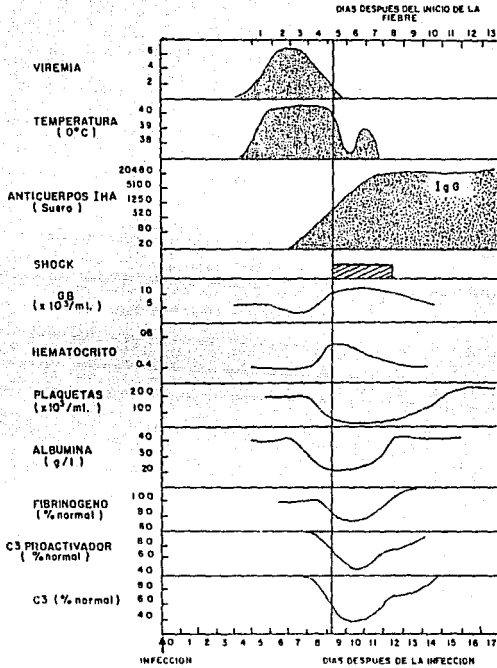


FIGURA # 5

CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO
DEL DENGUE CON SINDROME DE SHOCK

El shock está caracterizado por un pulso rápido y débil con la disminución de la presión sanguínea (20 mmHg o menos) o hipotensión con frío y piel pegajosa. Los pacientes en shock están en peligro de morir si no se les proporciona el tratamiento adecuado prontamente. Pueden pasar al estado de shock profundo en donde la presión sanguínea y el pulso son prácticamente imperceptibles. La duración de shock es corta; los pacientes pueden morir después de 12 a 24 horas o recuperarse rápidamente después de recibir la terapia anti-shock adecuada.

En los casos de shock profundo pueden presentarse mayores complicaciones - como acidosis metabólica y sangrado gastrointestinal, que indican un pronóstico pobre para la vida. La recuperación del apetito es un buen pronóstico. Durante la convalecencia es común observar bradicardia o arritmia sinusal.

La observación de que el shock ocurre principalmente durante una infección secundaria, sugiere un mecanismo inmunológico subyacente. Esta perspectiva - está apoyada en el descubrimiento de que en el estado agudo de la enfermedad, los niveles sanguíneos de C1q, C4, C5 - C6 y C3 proactivador se encuentran reducidos, y los valores catabólicos de C3 están elevados. En la mayoría de los - casos, el complemento es activado por ambas vías, la clásica y la alterna.

En general, los pacientes con DHF pueden desarrollar shock hipovolémico - debido a la pérdida de agua, electrolitos y proteínas plasmáticas hacia el espacio extravascular. Figura # 5

El espectro de DHF está clasificado de acuerdo a la severidad de la enfermedad en cuatro grados:

Grado I.- Fiebre acompañada por síntomas constitucionales no específicos; la única manifestación hemorrágica es la prueba de torniquete positiva.

Grado II.- Las manifestaciones de Grado I más sangrado espontáneo en piel y/o otras hemorragias.

Grado III.- Falla circulatoria manifestada por pulso rápido y débil, --
reducción de la presión sanguínea (20 mmHg o menos) o hipo-
tensión, con la presencia de piel pegajosa e intranquilidad.

Grado IV.- Shock profundo con pulso y presión sanguínea no detectable.

La presencia de trombocitopenia con la concurrente hemoconcentración dife-
renciará el DHF I y II de la fiebre clásica de Dengue.

El DSS se considera a partir del Grado III.

[4, 22, 23, 25, 26, 28, 41, 53, 57, 61]

7.- PATOGENESIS.

Poco se sabe acerca de la patogénesis de la fiebre producida por Dengue ,
ya que la mortalidad es rara.

Se sabe de manera general que el virus es transportado por el torrente san-
guíneo a las células, o a los tejidos por los que tiene tropismo. Después de
invadir tales células el virus desaparece en una fase de eclipse durante la
cual no es posible encontrarlo.

Se ha observado que cuanto más breve es el período de incubación, más agu-
do es el comienzo y el curso clínico de la enfermedad, en cambio, una incubación
prolongada es más insidiosa y a menudo más nociva.

En la Figura # 6 se muestra un esquema general para la diseminación de los
Flavivirus en el hospedero.

Después de la inoculación en piel, el virus se replica en tejidos locales
y ganglios linfáticos regionales. El virus es entonces llevado por vía linfá-
tica a la cavidad torácica y a torrente sanguíneo. Esta viremia primaria -

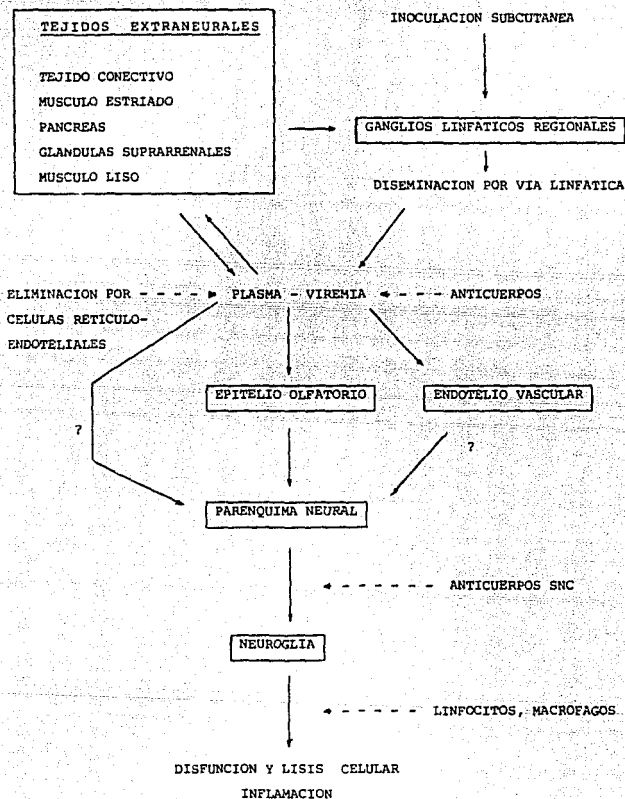


FIGURA # 6 ESQUEMA GENERAL DE LA PATOGENESIS DE LA INFECCION POR FLAVIVIRUS

Los bloques indican los sitios de replicación viral y las flechas punteadas los mecanismos de defensa inmune.

activa tejidos extraneurales, los cuales en su oportunidad apoyan una replicación viral posterior y sirven como una fuente para liberar más virus a circulación. Los sitios extraneurales principales para la replicación de los Flavivirus incluyen tejido conectivo, músculo esquelético, miocardio, músculo liso, endotelio vascular, tejidos linforeticulares y glándulas endócrinas y exócrinas.

El nivel de viremia es modulado por el grado de tolerancia por macrófagos, y es terminado por la aparición de anticuerpos, usualmente una semana después de la infección.

Sin embargo, ocurren otros fenómenos aún inexplicables, como son: el mecanismo que lleva al desarrollo de la permeabilidad capilar con necrosis focal en muchos órganos, la extravasación de eritrocitos hacia distintos tejidos, como se observa frecuentemente en la fiebre hemorrágica. Para el momento en que esto se presenta, los títulos de anticuerpos circulantes suelen ser demasiado altos, para que estos cambios se puedan atribuir directamente a la invasión, replicación o destrucción celular por los virus.

La patogénesis, por lo tanto es muy variada, refleja no solo la naturaleza del virus, sino la susceptibilidad tisular y el estado orgánico y fisiológico del propio hospedero. [4, 23, 51]

8.- INMUNOLOGIA.

La inmunidad adquirida después de una sola infección por virus del Dengue es probablemente vitalicia. Además, esta inmunidad se puede reforzar periódicamente por la infección clínica y subclínica con virus diferentes del mismo grupo serológico. Por ejemplo, la infección repetida con uno o más Flavivirus (Dengue) amplía el espectro de anticuerpos neutralizantes contra otros (Fiebre Amarilla); aunque en general la respuesta homóloga es mayor que la respuesta debida a una reacción cruzada. La proporción de personas con anticuerpos contra el virus endémico aumenta con la edad. [4]

En general, toda infección por virus de Dengue genera la producción de anticuerpos. Se consideran tres tipos diferentes de anticuerpos muy útiles para hacer el diagnóstico serológico. Cada uno tiene características propias en relación al tiempo de aparición, título máximo, declinación, persistencia y especificidad. En orden de aparición son: anticuerpos neutralizantes, anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y anticuerpos fijadores de complemento. [4, 22]

Los anticuerpos neutralizantes son los que generalmente aparecen primero y en cantidad suficiente para ser descubiertos y son los más específicos de tipo. Aumentan durante los primeros días de la enfermedad, alcanzan un máximo temprano y declinan lentamente y en baja proporción, el título se nivela en una meseta que dura muchos años o toda la vida. [22]

Los anticuerpos que inhiben la hemaglutinación aparecen generalmente al mismo tiempo o inmediatamente después del desarrollo de los anticuerpos neutralizantes. Alcanzan pronto un título alto y después caen rápidamente. Estos anticuerpos tienen el espectro más amplio de reactividad para los virus relacionados antigénicamente con el virus de Dengue, de un complejo o grupo particular. [22]

Los anticuerpos fijadores de complemento aparecen una semana después o más al desarrollo de los anteriores para el virus de Dengue. Además de su aparición tardía, su título más alto es de corta duración, a menudo desaparece o baja rápidamente a niveles escasamente demostrables dentro de pocos meses, un año o más, siguientes a la infección aguda por el virus. [4, 17, 22]

Las observaciones epidemiológicas y serológicas en los casos de Dengue con síndrome de shock, sugieren que esta enfermedad suele estar asociada con una segunda infección de Dengue, y que ocurre de seis meses a dos años después de una infección anterior con un serotipo diferente.

Los cuatro serotipos de virus de Dengue tienen determinantes antigénicos en común, que pueden producir una reacción cruzada, pero esta reacción cruzada no proporciona protección duradera a los serotipos heterólogos, y en el mismo individuo ocurren infecciones posteriores con tipos diferentes.

Halstead ha postulado que el síndrome de shock representa un tipo de respuesta de hipersensibilidad, es decir, la respuesta acelerada de anticuerpos durante la segunda infección que puede provocar la formación de complejos

virus - anticuerpos, con la consecuente fijación de complemento que conduce a la formación de un potente factor de permeabilidad C3a.

Evidencias experimentales sugieren que la activación del complemento es un factor determinante en el síndrome de shock. La enfermedad que afecta predominantemente a niños de 4 a 12 años de edad es endémica en áreas urbanas del sureste de Asia, frecuentemente en temporadas de lluvia.

Se ha propuesto que pacientes reinfectados con un tipo de virus de Dengue diferente, desarrollan una respuesta anamnésica de anticuerpos que resulta en la formación de altas concentraciones de anticuerpos antivirales no protectivos presentes tempranamente en el curso de la enfermedad.

Estos anticuerpos, no obstante son capaces de reaccionar con el tipo heterólogo de virus, dando de ese modo un incremento en los complejos antígeno - anticuerpo.

La observación de bajas concentraciones en suero de C3 en shock por Dengue sugieren fuertemente la activación del complemento por complejos inmunes.

El mecanismo de activación de C3 y C5 involucra en cada instancia la disociación de un fragmento de bajo peso molecular con potencial actividad productora de shock. Ambas anafilotoxinas (C3a y C5a) liberan histamina, incrementando la permeabilidad vascular y producen vasodilatación. Además la activación del complemento puede afectar la activación plaquetaria e iniciar la coagulación sanguínea. [21, 25, 51, 57]

Esta teoría no ha sido comprobada y existe la posibilidad de que el síndrome de shock observado en los niños, así como algunos casos de fiebre hemorrágica en niños y adultos sea el resultado de la aparición de cepas extraordinariamente virulentas (Hipótesis de Rosen).

Ni la hipótesis de Halstead sobre la infección secundaria ni la de Rosen, basada en el papel de la virulencia de las cepas circulantes, pueden explicar individualmente todos los casos.

Resulta evidente que el fenómeno es mucho más complejo y que no se relaciona exclusivamente con factores del hospedero o del virus, sino que la acción del virus sobre el hospedero debe analizarse teniendo en cuenta los factores derivados de esta interacción.

Se ha elaborado una hipótesis unificadora integral y multifactorial que puede aplicarse a diferentes situaciones.

En ésta, se expresa que para que ocurra una epidemia de DHF/DSS es necesario que se produzca la concurrencia de tres grupos de factores de riesgo: los epidemiológicos, los individuales y los virales. Los factores epidemiológicos y virales son los que determinan la aparición de la enfermedad en forma epidémica. Los factores individuales predisponen a determinado grupo étnico, sexo o persona con enfermedad crónica a padecer con mayor frecuencia la enfermedad -- severa. La preexistencia de anticuerpos planteada por Halstead constituye el factor individual de riesgo de mayor importancia, aunque evidentemente no es el único. Figura # 7 [3, 30]

9.- INMUNOPATOGENESIS.

Estudios patogénicos en infecciones de Dengue en el hombre y en monos --- rhesus, muestran que el virus de Dengue tiene una marcada predilección por tejido linfóide. El antígeno viral ha sido visualizado en macrófagos, histiocitos y células de Kupffer. Un reciente descubrimiento es que el virus puede recuperarse de leucocitos circulantes en sangre periférica, durante la fase aguda de DHF/DSS. Estas células han sido identificadas provisionalmente como monocitos.

La posibilidad de que fagocitos mononucleares puedan ser sitios principales de infección por Dengue en el hombre es importante en relación a observaciones fundamentales en interacciones virus del Dengue - monocitos.

Los virus de Dengue se replican fácilmente en cultivos de monocitos humanos de sangre periférica, si el donador es inmune a Dengue. (5)

La replicación del virus también ocurre en cultivo de monocitos de personas susceptibles, cuando se adicionan concentraciones subneutralizantes de --- anticuerpos contra Dengue al medio de cultivo. Sin anticuerpos los cultivos de suspensión de monocitos de personas susceptibles son relativamente no permisivos a la infección por este virus.

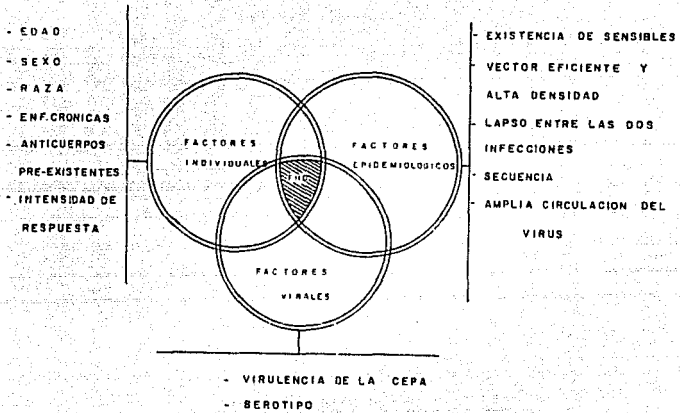


FIGURA # 7

FACTORES DE RIESGO PARA CONTRAER FIEBRE HEMORRAGICA DE DENGUE

Este fenómeno de amplificación inmune requiere la unión de complejos IgG-- anti Dengue - virus de Dengue a receptores celulares para Fc. Esto media la interacción del complejo inmune, dando como resultado la infección del monocito.

La amplificación inmune de la infección por Dengue en cultivo de monocitos, in vitro, se asemeja al fenómeno in vivo. Monos infectados individualmente con virus de Dengue tipos 1, 3 ó 4 y reñados después con Dengue tipo 2, presentaron niveles de virus circulantes tan altos como los controles susceptibles -- infectados con la misma cepa y dosis de Dengue tipo 2. En otros experimentos, animales no inmunes, fueron inyectados intravenosamente con pequeñas cantidades de suero humano Dengue - inmune y después infectados con Dengue tipo 2. Estos animales tuvieron en circulación 51 veces más virus que los monos inyectados con suero normal. [25]

Para comprender cómo se produce el síndrome de shock en el hombre, puede ser importante estudiar la relación entre la infección de fagocitos mononucleares y la generación de factores de permeabilidad vascular, la activación del complemento y el sistema de coagulación sanguínea. Es interesante conocer las propiedades biológicas de los fagocitos mononucleares humanos activados, incluyendo la liberación de enzimas que dividen C3, la liberación de tromboplastina leucocitaria y la generación de uno o más factores de permeabilidad vascular. Este fenómeno efector generado por este sistema celular puede apreciarse para todos los cambios fisiológicos mayores en el síndrome de shock por Dengue.

De los estímulos endógenos, se sabe que C3b, complejos inmunes y linfocinas activan a los fagocitos mononucleares. [25]

Una hipótesis para el shock producido por Dengue es, que la respuesta de eliminación dirigida contra los fagocitos mononucleares infectados con Dengue, es el evento que activa esas células. Como soporte de esta posibilidad, se sabe que la competencia de la respuesta inmune está bajo control genético y nutricional. Con respecto a su habilidad para combatir una enfermedad infecciosa, las mujeres son consideradas generalmente como inmunológicamente más competentes que los hombres, y los individuos bien nutridos más competentes inmunológicamente que los desnutridos. Se ha notado que el DHF/DSS ocurre más frecuentemente en mujeres que en hombres y en individuos bien nutridos que en desnutridos. [3, 16, 21, 25, 30]

En base a los estudios precedentes clínicos y experimentales se ha desarrollado un modelo simple molecular y celular para el DHF/DSS. Figura # 8

(A) MECANISMO AFERENTE: En presencia de anticuerpos amplificadores -- (anticuerpos complejados con virus pero no inactivos) los complejos inmunes se unen a receptores Fc disparando la fagocitosis seguida por la replicación del virus. Debido a que los fagocitos mononucleares pueden ser móviles, pueden diseminar la infección, así como también, proporcionar un sitio para la replicación. el virus de Dengue se replica en médula ósea, hígado, bazo, tejido linfóide intestinal e histiocitos en piel. Un principio central de la hipótesis de amplificación inmune es que los anticuerpos amplificadores regulan el número de células infectadas, a más células infectadas, más severa es la enfermedad.

(B) MECANISMO EFECTOR: Se cree que las mayores anomalías patofisiológicas son causadas por factores liberados por fagocitos mononucleares activados, que están infectados con Dengue.

En la respuesta inmune, posiblemente los linfocitos T, puedan ser importantes en la activación de fagocitos mononucleares.

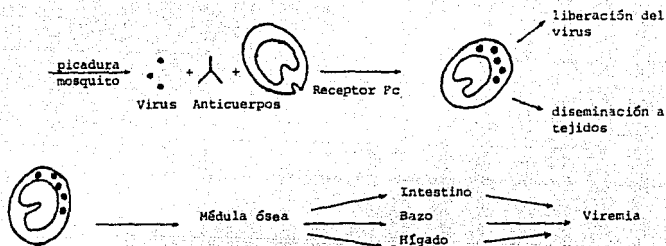
La nutrición, el sexo y factores genéticos pueden ser importantes en la modulación individual de la infección a través de su efecto regulador en la función de los linfocitos T y los fagocitos mononucleares. [25]

10.- DIAGNOSTICO.

A) CLINICO.

El siguiente criterio ha sido seleccionado para el diagnóstico clínico de Dengue, y en un 90% de los casos, la infección por Dengue ha sido confirmada -- por el laboratorio.

A.- MECANISMO AFERENTE:



B.- MECANISMO EFECTOR:

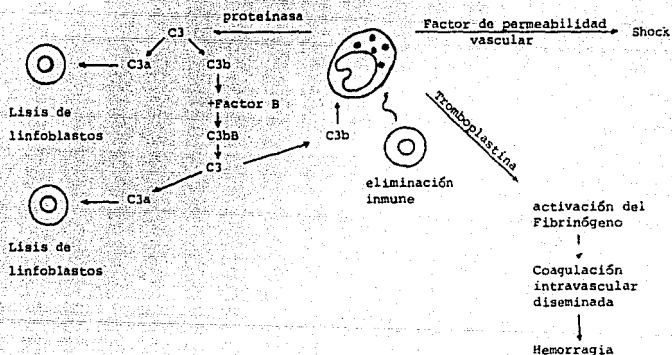


FIGURA # 8

MODELO DE LA PATOGENESIS DE LA FIEBRE
HEMORRAGICA Y SINDROME DE SHOCK

- 1) Fiebre.- Inicio agudo, elevada, continua y constante de por lo menos 2 a 7 días.
- 2) Manifestaciones hemorrágicas que incluyen por lo menos, prueba de -- torniquete positiva y cualquiera de los siguientes: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, sangrado de encías, hematemesis y/o melena.
- 3) Agrandamiento de hígado.
- 4) Shock.- Manifestado por pulso rápido y débil, con disminución de la presión sanguínea o hipotensión, con la presencia de frío, piel pegajosa e inquietud.

B) LABORATORIO.

El virus de Dengue se puede aislar de muestras tomadas durante la fase -- aguda de la enfermedad. Estas muestras son inoculadas en un sistema hospedero el cual puede ser: animales de laboratorio (ratón lactante) o cultivos celulares, éstos son preferentemente usados en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S.E.T.), en donde las muestras son inoculadas en una línea -- celular derivada de células de mosquitos: TRA-284.

En general diversas líneas celulares soportan la replicación del virus in vitro, dentro de las más utilizadas para estudios de replicación de virus de Dengue están: LLC-MK₂ (continuas de riñón de mono rhesus), Vero (continuas de riñón de mono verde), BHK (continuas de riñón de hámster), PK (continuas de riñón de cerdo), HeLa (derivadas de células cancerosas de cérvix), células de Aedes pseudoscutellaris, etc.

La presencia de virus se identifica por la formación de placas, cambios -- citopáticos, por inmunofluorescencia o visualización del antígeno con fluorocromo, o bien un antígeno marcado con una enzima. [1, 11, 12]

Los sistemas más usados para la cuantificación del virus de Dengue son: los ensayos en placa empleando diversos cultivos celulares y usando monocapas - de agar, carboxi-metil-celulosa, tragacanto, etc. [11, 13, 24, 39, 44]

En la mayoría de los sistemas las placas formadas por el virus se producen en forma relativamente lenta, que va de cinco a siete días y frecuentemente no son acompañadas por muerte celular o cambios citopáticos visibles, por lo que se recurre a la tinción con colorante vitales, como por ejemplo el rojo neutro.

El aislamiento de estos virus es difícil y no siempre se logra, por lo cual los métodos serológicos son una herramienta muy útil para el diagnóstico.

Entre los métodos serológicos que pueden utilizarse están:

- a) Inhibición de la hemaglutinación (IHA).
- b) Fijación de complemento (FC).
- c) Neutralización viral (Nt).
- d) Captura de IgM por el método de ELISA (en desarrollo).

Debido a la mayor especificidad de la neutralización viral y a que puede ser utilizada para identificar un aislamiento o para determinar el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en sueros pareados contra determinado serotipo - de virus de Dengue, nuestro propósito es estandarizarla en el laboratorio de -- Virología del ISET, adaptándola a cultivo celular (LLC-MK₂) y observando la disminución de la formación de placas cuando son retados virus - sueros (anticuerpos). Esperando que ésta técnica sea de gran apoyo al laboratorio, pues en - la mayoría de los casos no se logra el aislamiento viral, y en la prueba de IHA se presenta un elevado cruce antigénico entre los diferentes serotipos de virus de Dengue.

El diagnóstico etiológico de la infección se establece por el aislamiento del virus y la demostración de un aumento en el título de anticuerpos.

11.- TRATAMIENTO.

El tratamiento es enteramente sintomático, ya que no existe terapéutica -

específica. En términos generales el tratamiento es el siguiente:

- a) Reposición inmediata del plasma perdido (rehidratación).
- b) Reposición continua de plasma adicional para mantener el volumen circulante.
- c) Otros trastornos de los electrolitos y del metabolismo pueden necesitar corrección específica.
- d) Sedantes.
- e) Tratamiento con oxígeno.
- f) Transfusión de sangre.
- g) Vigilancia del tratamiento anti- shock.

12.- PREVENCIÓN Y CONTROL.

El control ideal de una enfermedad sería a través de la erradicación del agente causal; sin embargo esto es impráctico en el caso del Dengue debido a su asociación con los vertebrados silvestres para su persistencia endémica. Por lo tanto, las medidas de control están dirigidas hacia la interrupción del ciclo epidémico: inmunización, erradicación del vector y reducción del hospedero vertebrado silvestre.

La erradicación del vector o la reducción por debajo de la densidad de población crítica es la mejor medida de control con que se cuenta en la actualidad. Los lugares favoritos donde se desarrollan los mosquitos se destruyen o se rocían con insecticidas como el D.D.T. o Malatión. Esta técnica es muy efectiva en áreas urbanas y periurbanas, pero es impráctica y costosa en la selva misma.

Se recomienda que las personas susceptibles eviten las áreas infestadas por mosquitos, que usen repelentes, mosquiteros, ropa adecuada y protejan puertas y ventanas con tela de alambre.

En general, la vacunación en masa con vacuna de virus vivo atenuado, que confiere años de inmunidad con una sola inoculación, es una medida efectiva de control. Pero para Dengue, no ha sido posible la producción de una vacuna, -- debido a las posibilidades existentes para la presentación de la forma severa de la enfermedad.

El programa para la producción de una vacuna, se encuentra dirigido hacia la producción de vacunas de segunda generación, usando avances biotecnológicos basados en la ingeniería genética y tecnología de hibridomas. La identificación de epitopes críticos en las proteínas virales estructurales y no estructurales, puede usarse para estimular la protección contra el reto por virus. Esto se realiza por la caracterización antigénica de los virus de Dengue usando anticuerpos monoclonales y por la clonación y secuencia de genes virales relevantes, poniendo particular atención en la proteína de envoltura (E), la cual es el blanco mayor de la respuesta inmune del hospedero. [4, 20, 25, 47, 61]

OBJETIVOS

II.- O B J E T I V O S

- 1.- Determinación de los títulos de anticuerpos contra los serotipos 1, 2 y 4 de virus de Dengue, en sueros provenientes de diferentes estados de la República Mexicana por la prueba de Inhibición de la hemaglutinación (IHA).
- 2.- Adaptación de la prueba de Neutralización en placa (NP) en la línea celular LLC-MK₂:
 - a) A botella
 - b) A microplaca.
- 3.- Identificación del serotipo infectante en muestras que presentan reactividad cruzada contra los diferentes serotipos de Dengue, mediante la prueba de Neutralización en Placa.
- 4.- Evaluación del tipo de respuesta serológica (primaria o secundaria) en sueros parados, mediante la interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de IHA y NP.
- 5.- Detectar la actividad de Dengue tipo 3, por medio de la determinación de anticuerpos contra este serotipo, en las muestras trabajadas por la técnica de NP.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

III.- MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

A.- MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1.- Sueros de pacientes con diagnóstico probable de Dengue, enviados por los Centros Regionales de Salud de diferentes Estados de la República Mexicana al Laboratorio de Virología del I.S.E.T., tomados en fase aguda y convalesciente de la enfermedad. Tabla # 3
- 2.- Ratonas albinos suizos de 1 a 2 días de edad.
- 3.- Antígeno para la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación: Dengue (Den) - 1, Den - 2, Den - 3 y Den - 4, elaborados en el Laboratorio de Virología del I.S.E.T. (Apéndice I.0)
- 4.- Antígenos de referencia para la prueba de Neutralización: Jen - 1 -- (Hawaii), Den - 2 (NG-C), Den - 3 (H - 87) y Den - 4 (H - 241), adaptados a -- cultivo celular (TRA - 284). (Apéndice III)
- 5.- Conjugados de isotiocianato de fluoresceína para detección de los - virus de Dengue, enviados por Centers for Diseases Control (C.D.C.) de Atlanta Ga. U.S.A. (Apéndice IV)
- 6.- Anticuerpos monoclonales anti - Dengue tipo específicos.
- 7.- Cultivo de células TRA - 284.
- 8.- Cultivo de células LLC - MK₂.

- 9.- Suero fetal bovino, inactivado a 56 °C durante 30 minutos.
- 10.- Glóbulos rojos de ganso macho (los gansos son controlados en el laboratorio del I.S.E.T.).
- 11.- Albúmina bovina fracción V.
- 12.- Solución de tripsina al 0.25% (Apéndice I.0)

B.- MATERIAL DE LABORATORIO.

- 1.- Pipetas estériles de 1, 2, 5 y 10 ml.
- 2.- Vasos de precipitado de 50, 150 y 250 ml.
- 3.- Matraces volumétricos de 500, 1000 y 2000 ml.
- 4.- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml.
- 5.- Mortero.
- 6.- Jeringas de 10 ml y de insulina con agujas calibre 20, 21, 26 y 27.
- 7.- Equipo para microtitulación:
 - a) Placas de poliestireno fondo en U de 96 pozos.
 - b) Micropipetas calibradas de 25 y 50 microlitros.
 - c) Microdiluctores de 25 y 50 microlitros.
- 8.- Material para cultivo celular:
 - a) Botellas para cultivo celular de 50 ml (25 cm²).
 - b) Placas de poliestireno para cultivo celular de 24 pozos.
 - c) Tubos con tapón de rosca (13 X 100).
- 9.- Frascos de varios tamaños.
- 10.- Porta y cubreobjetos.
- 11.- Tubos de ensayo 13 X 100.
- 12.- Tubos graduados para centrifuga.
- 13.- Viales de poliestireno y/o vidrio de 2 y 5 ml.
- 14.- Bulbo de goma y perilla de seguridad
- 15.- Pinzas de disección
- 16.- Mechero.

C.- APARATOS.

- 1.- Microscopio óptico, normal e invertido.
- 2.- Microscopio de fluorescencia.
- 3.- Incubadoras a 28, 34 y 37 °C. (THELCO GCA, CO. Modelo G)
- 4.- Incubadora con atmósfera de CO₂ al 5%. (Lab. Line Instruments, Inc. Modelo 417)
- 5.- Balanza analítica (Mettler H 8) y granataria (OHAUS Harvard trip)
- 6.- Centrífuga refrigerada. (DAMON IEC, CO. DPR 6000)
- 7.- Potenciómetro. (Beckman Zeromatic SS-3 Mod. 96)
- 8.- Refrigerador a 4 °C. (Lab. Line Instruments, Inc. Frigid Cab)
- 9.- Equipo de filtración Millipore.
- 10.- Congeladores a - 20 y - 70 °C. (RHEEM - REVCO - Ultra Low Mod. ULT 1185 B- L - K)
- 11.- Vortex. (Vortex Genie 2, Scientific Ind. Mod. G - 560)
- 12.- Agitador horizontal para microplacas. (Minishaker - Dinotech Products Cat. 002-963-0900)
- 13.- Agitador mecánico para tubos. (Dinotech Products)
- 14.- Flujo laminar vertical. (VECO, SA. Mod. H)
- 15.- Autoclave. (AMSCO S.A.)
- 16.- Baño Maria o parrilla eléctrica (Corning hot plate). (Lab. Line -- Instruments, Inc.)

D.- SOLUCIONES Y REACTIVOS.

(Ver preparación en el Apéndice I.0)

- 1.- Dextrosa - Gelatina - Veronal (DGV).
- 2.- Solución de Alsever's.

- 3.- Cloruro de sodio 0.85% y 1.5 M.
- 4.- Fosfato de sodio dibásico 2.0 M.
- 5.- Fosfato de sodio monobásico 2.0 M.
- 6.- Acido bórico 0.5 M.
- 7.- Solución de borato pH = 9.
- 8.- Borato salino - Albúmina bovina 0.4% (BABS).
- 9.- Suspensión de kaolín al 25% (lavado ácido).
- 10.- Medio 199 en solución salina balanceada de Hank's con rojo de fenol.
- 11.- Solución de penicilina y estreptomicina a una concentración final de 100 UI y 100 mcg/ml respectivamente.
- 12.- PBS, pH = 7.5.
- 13.- Agar purificado Difco.
- 14.- Medio 199 en solución salina de Hank's sin bicarbonato y sin rojo de fenol (10 X).
- 15.- Bicarbonato de sodio al 7.5%.
- 16.- DEAE - dextrán 2% en solución salina de Hank's.
- 17.- Vitaminas en medio basal Eagle (100 X).
- 18.- Aminoácidos en medio basal Eagle (100 X).
- 19.- Sacarosa.
- 20.- Acetona.
- 21.- Tris - hidroximetil aminometano.
- 22.- Beta - propiolactona.
- 23.- Alcohol al 70%.
- 24.- Buffer de PBS - Glicerina.
- 25.- Rojo neutro 1:300, solución estéril.

METODOLOGIA

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

FUNDAMENTO

La hemaglutinación viral es el agrupamiento o unión de glóbulos rojos debido al virus o a algunas propiedades específicas del virus. Los glóbulos rojos tienen algunos sitios receptores los cuales tienen afinidad por el antígeno viral. El antígeno viral hemaglutinante o hemaglutinina actúa como un puente entre los sitios receptores de los eritrocitos, ocasionando de este modo la hemaglutinación.

La hemaglutinación es inhibida por anticuerpos específicos. La prueba de inhibición de la hemaglutinación es usada para identificar, demostrar inmunidad y para estudiar relaciones antigénicas entre virus. [4, 22]

- A.- Preparación de glóbulos rojos de ganso;
 - 1.- Sangrar asépticamente al ganso de la vena del ala usando una jeringa con aguja del número 20, conteniendo 1.5 ml de solución de Alsever's por cada 8.5 ml de sangre.
 - 2.- Filtrar en gasa estéril para eliminar la presencia de coágulos.
 - 3.- La sangre se lava tres veces en DGV.
 - 4.- Se coloca en un tubo de centrifuga y se centrifuga a 1,500 rpm durante 15 minutos.
 - 5.- Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 8%.
 - 6.- A partir de esta suspensión, se prepara otra suspensión de glóbulos rojos 1:24 usando como diluyente los PBS's de pH's diferentes (6.0, 6.2, 6.4, 6.6 y 6.8).

B.- Tratamiento de sueros:

Extracción con kaolín y adsorción con glóbulos rojos de ganso.

1.- Se etiquetan tubos de ensayo (13 X 100) y se adiciona:

Suero a probar 0.1 ml
Borato salino pH= 9 0.4 ml
Kaolín al 25% 0.5 ml

Se mezclan y se agitan durante 30 minutos en un agitador mecánico -- horizontal.

2.- Centrifugar a 2,500 rpm durante 30 minutos.

3.- Decantar el sobrenadante y adicionar una gota (aproximadamente 0.1ml) del paquete celular de glóbulos rojos de ganso, mezclar.

4.- Se colocan los tubos 20 minutos a 4 °C, con agitación ocasional.

5.- Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a 4 °C.

6.- Decantar el sobrenadante. El sobrenadante es una dilución 1:10 del suero original.

C.- Titulación del antígeno:

1.- Se prepara una dilución del antígeno 1:10 en BABS, pH = 9 (mantener en baño de hielo).

2.- Realizar diluciones dobles del antígeno en placas de microtitulación probando diferentes pH's. Ver figura # 9

Adicionar 0.1 ml de la dilución del antígeno 1:10 al primer pozo; - del segundo pozo en adelante agregar 0.05 ml de BABS. Utilizando microdilutores de 0.05 ml hacer las diluciones, pasando del primer pozo al segundo y a través de todos los pozos restantes. Descartar los 0.05 ml del último pozo.

3.- Agitar la placa.

4.- Preparar los glóbulos rojos de ganso en los diferentes pH's (suspensión 1:24) y adicionar 0.05 ml a cada pozo.

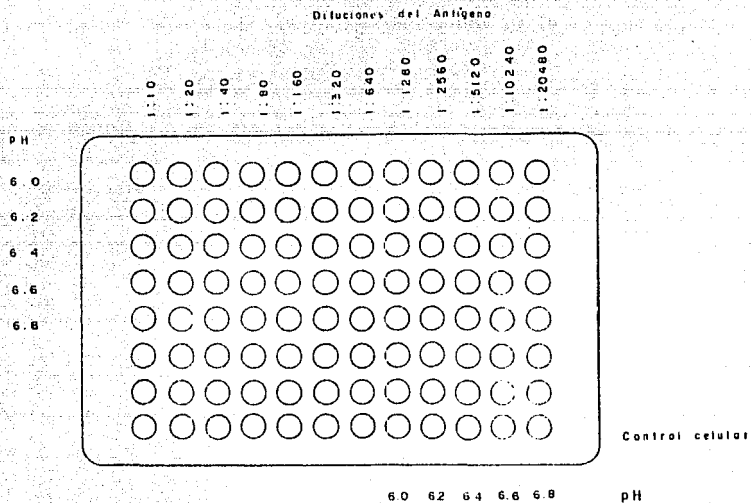


FIGURA 19

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

5.- Se agita la placa y se incuba a temperatura ambiente (22 - 27 °C) - sin mover, durante 30 minutos.

6.- Determinar el título de hemaglutinación y el pH óptimo. Para la prueba de inhibición de la hemaglutinación se prepara la dilución del antígeno - que contenga de 4 a 8 unidades hemaglutinantes (UHA)/0.025 ml.

1 UHA = La más alta dilución de antígeno que muestra una hemaglutinación - completa.

D.- Titulación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación:

1.- Marcar las placas con el número de suero y el antígeno a probar.

Ver figura # 10

2.- Colocar 0.05 ml del suero tratado en el primer y último pozo, del -- segundo pozo al último agregar 0.025 ml de BABS. Realizar las diluciones utilizando microdilutores de 0.025 ml.

3.- Adicionar a cada pozo 0.025 ml de antígeno (diluido lo necesario -- para contener de 4 a 8 UHA/0.025 ml), agitar la placa en un agitador mecánico - para microplacas.

4.- Cubrir la placa e incubar a 4 °C toda la noche.

5.- Al día siguiente, se colican las placas a temperatura ambiente y se prepara la suspensión de glóbulos rojos 1:24 en el pH óptimo; se agrega 0.05 ml de esta suspensión a cada pozo. El pH óptimo es aquel en el cual se presenta la máxima hemaglutinación.

6.- Se agita la placa y se incuba a temperatura ambiente de 30 a 45 min.

7.- Leer el título de inhibición de la hemaglutinación.

El título se tiene en la más alta dilución de suero que no presenta hemaglutinación (inhibición completa de la hemaglutinación).

Deben montarse los siguientes controles:

a) Retrotitulación del antígeno.

b) Suero homólogo positivo para cada antígeno (control positivo).

DILUCIONES DE SUERO

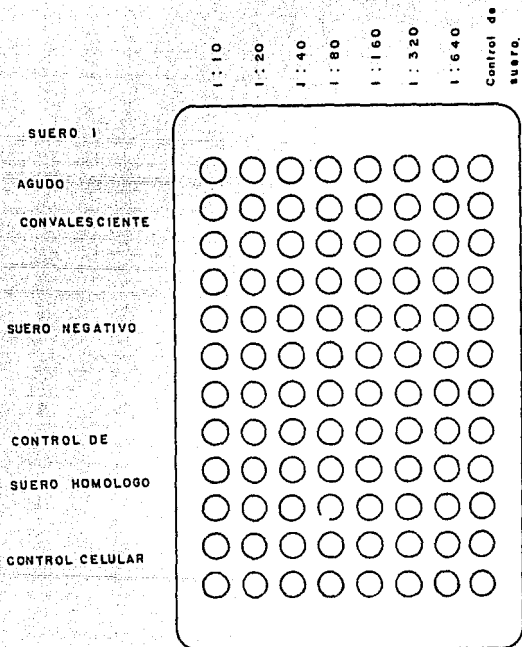


FIGURA # 10

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

- c).- Control de glóbulos rojos de ganso para cada suero.
- d).- Control de glóbulos rojos de ganso, sin suero y sin antígeno.

PRUEBA DE NEUTRALIZACION EN MICROPLACA.

FUNDAMENTO

La neutralización viral se define como la pérdida de la infectividad debida a la reacción del virus con su anticuerpo específico. La formación de anticuerpos humorales contra ciertos virus es el resultado de un contacto con el virus por infección natural o inmunización.

Para realizar la prueba de neutralización, se colocan juntos virus y suero bajo condiciones apropiadas, se incuban y se inoculan a un sistema susceptible, en el cual la presencia del virus puede ser detectada. La presencia del virus sin neutralizar se puede demostrar por efecto citopático, formación de placas e inhibición metabólica en cultivo de tejidos.

La prueba de neutralización puede usarse para identificar un virus aislado o para medir la respuesta de anticuerpos de un individuo a un virus. (4, 22)

I.- Estandarización del virus.

A.- Identificación de los serotipos (4) de virus del Dengue por la prueba de anticuerpos fluorescentes. Ver Apéndice IV.

B.- Formación de placas virales en botella:

1.- Preparar diluciones del virus a probar, de 10^{-1} a 10^{-6} en medio de mantenimiento; realizar todas las diluciones en baño de hielo.

2.- Inocular 0.2 ml de cada dilución de virus a una monocapa confluyente de células LLC - MK₂ cultivadas en una botella de 25 cm² (hacerlo por triplicado).

3.- Incubar a 34 - 35°C durante una hora para permitir la adsorción del inóculo. Redistribuir el inóculo a intervalos de 15 a 20 minutos.

4.- Agregar 7 ml de la primera capa de agar. (Apéndice I.I)

5.- Invertir las botellas e incubar a 34°C durante 7 días.

6.- Teñir la monocapa con 4 ml de la segunda capa de agar conteniendo -- rojo neutro. (Apéndice I.I.) Esperar a que solidifique y proteger las botellas de la luz. Incubar a 34°C durante 90 minutos en posición normal, invertir e incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. El tiempo necesario para observar las placas claras, depende del tipo y cepa de Dengue.

7.- Contar las placas y calcular las unidades formadoras de placa (UFP)/ mililitro de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UFP = \# \text{ de placas contadas} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times \frac{1}{\text{vol. del inóculo}}$$

C.- Formación de placas virales en microplaca:

1.- Se parte de una monocapa confluyente de células LLC - MK₂ cultivadas en una microplaca de poliestireno (24 pozos). (Apéndice II)

2.- Decantar el medio de las placas por inversión, sobre un recipiente-- estéril. Realizar las diluciones del virus usadas en plaqueo en botella.

3.- Inocular 0.05 ml de cada dilución de virus por triplicado.

4.- Permitir la adsorción del inóculo durante 1 hr a 34 - 35°C con agitación cada 15 min.

5.- Agregar 0.5 ml de la primera capa de agar y esperar a que solidifique.

6.- Incubar en posición invertida a 34 - 35°C en una incubadora con -- atmósfera húmeda y 5% de CO₂ de 4 a 7 días.

- 7.- Teñir con 0.5 ml de la segunda capa de agar, esperar a que solidifique e incubar en esta posición 90 minutos a 34 - 35°C.
- 8.- Incubar en posición invertida toda la noche.
- 9.- Contar el número de placas y calcular las UFP/ml.

II.- Determinación de anticuerpos neutralizantes en microplaca:

- 1.- Filtrar los sueros a probar.
- 2.- Inactivar a 56°C durante 30 min.
- 3.- Diluir los sueros en medio de mantenimiento. Las diluciones probadas son: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640.
- 4.- Mezclar 0.4 ml de cada dilución de suero con 0.4 ml de la dilución del virus estandarizado, e incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
- 5.- Inocular 0.05 ml de la mezcla virus - suero a cada pozo con crecimiento celular confluyente (hacerlo por triplicado).
- 6.- Incubar una hora a 34 - 35°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Agitar -- cada 15 min.
- 7.- Agregar 0.5 ml de la primera capa de agar, esperar que solidifique e incubar en posición invertida durante 5 días. Esta incubación se realiza en incubadora con atmósfera de CO₂ (5%).
- 8.- Teñir con 0.5 ml de la segunda capa de agar, esperar que solidifique e incubar 90 minutos a 34 - 35°C, invertir las placas e incubarlas a temperatura ambiente toda la noche.
- 9.- Contar las placas y determinar el título del suero (dilución en donde se presente el 50% de reducción del número de placas formadas).

RESULTADOS

En un período de ocho meses se recibieron aproximadamente 2,500 muestras para el diagnóstico de Dengue, de las cuales fueron seleccionadas 30 muestras (28 muestras pareadas y 2 muestras únicas) para montarse por la prueba de Neutralización.

La técnica de inhibición de la hemaglutinación es la más utilizada, el antígeno para esta prueba obtenido por la inoculación en cerebro de ratón lactante da títulos elevados. La tabla número 1 nos muestra la titulación de nuestro antígeno. Como se observa, para Den-1 se obtienen los mayores títulos de hemaglutinación entre pH's de 6.0 a 6.4; para Den-2 los títulos de máxima hemaglutinación están en el rango de pH's 6.4 a 6.8 y para Den-4 entre 6.6 y 6.8.

La especificidad de estos antígenos se probó retándolos con sueros homólogos estándar, los resultados se muestran en la tabla # 2. El antígeno de Encefalitis Equina de Venezuela se utilizó como control de grupo, ya que éste es un Alfavirus, no hay reactividad cruzada y los títulos observados son menores de 1:10.

Para el diagnóstico de una infección por virus del Dengue, es importante considerar los síntomas del paciente, los cuales llegan a ser clásicos. En la tabla # 3 se encuentran relacionadas las muestras seleccionadas. Los síntomas característicos son: fiebre, cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias y algunos casos con exantema. La diarrea suele ser un síntoma que llega a presentarse en los pacientes que desarrollan la forma severa de la enfermedad.

En la tabla # 4 se reúnen los resultados obtenidos por la prueba de inhibición de la hemaglutinación, así como los días en que fueron tomadas las muestras y los resultados de aislamiento (este se realiza cuando la muestra es tomada durante los 5 primeros días de la enfermedad). La mayoría de las muestras presentan amplia reacción cruzada entre los serotipos de Dengue, pero para la Encefalitis Equina de Venezuela no hay título de anticuerpos detectable (menor de 1:10).

La tabla # 5 resume las características del desarrollo de placas de los virus de Dengue en células LLC - MK₂ creciendo en botellas para cultivo celular. Como se observa el tiempo de desarrollo de placas fue el mismo para los cuatro serotipos (ocho a nueve días) y la dilución utilizada fue baja (10^{-1}).

El desarrollo de placas por virus del Dengue en microplacas se muestra en la tabla # 6. La formación de placas por virus del Dengue tipo 4 en microplaca, requiere de mayor tiempo de incubación y su diámetro es mayor que el de los otros serotipos.

Los distintos serotipos de virus de Dengue presentan diferencias en las características morfológicas de las placas formadas, que pueden servir para su identificación. Estas características se resumen en la tabla # 7.

Debido a que los resultados de IHA no fueron concluyentes en cuanto a sero tipo infectante y tipo de infección, se probaron los sueros por Neutralización en microplaca; los resultados obtenidos se encuentran en la tabla # 8. Se reportan los resultados de muestras tanto de fase aguda como de convalescente.

TABLA # 1

TITULACION DEL ANTIGENO ESTANDAR

ANTIGENO	pH	DILUCIONES DEL ANTIGENO									
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	
Den-1	6.0	+	+	+	+	+	+	+/-	0	0	
	6.2	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	0	
	6.4	+	+	+	+	+	+	+	+/-	0	
	6.6	+	+	+	+	+	+	0	0	0	
	6.8	+	+	+	+	+	+/-	0	0	0	
Den-2	6.0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	
	6.2	+	+	0	0	0	0	0	0	0	
	6.4	+	+	+	+/-	0	0	0	0	0	
	6.6	+	+	+	+	+/-	0	0	0	0	
	6.8	+	+	+	+/-	0	0	0	0	0	
Den-4	6.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6.4	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6.6	+	+	+/-	0	0	0	0	0	0	
	6.8	+	+	+	+/-	0	0	0	0	0	

+ = Hemaçlutinación total.

+/- = Hemaglutinación parcial.

0 = Formación de botón

TABLA # 2 RESULTADOS POR IHA PARA OBSERVAR LA ESPECIFICIDAD DE ANTIGENOS CONTRA SUEROS HOMOLOGOS ESTANDAR.

ANTIGENO	ANTISUEROS ESTANDAR			
	Den-1	Den-2	Den-4	E E V
Den-1	<u>160</u>	20	40	< 10
Den-2	20	<u>160</u>	40	< 10
Den-4	10	20	<u>80</u>	< 10
E E V	< 10	< 10	< 10	<u>160</u>

El título se expresa como el recíproco de la dilución de suero que presenta una inhibición de la hemaglutinación completa.

TABLA # 3 RELACION DE MUESTRAS TRABAJADAS

# DE MUESTRA	ORIGEN	EDAD-SEXO	SINTOMAS				
			F.	D.R.O.	M / A	C.	E.
1	CHIAPAS	S/H-Fem.				S/H	
2	CHIAPAS	S/H-Fem.				S/H	
3	COAHUILA	S/H-Fem.				S/H	
4	COAHUILA	S/H-Mas.				S/H	
5	COAHUILA	S/H-Mas.				S/H	
6	COAHUILA	S/H-Mas.				S/H	
7	COAHUILA	S/H-Fem.				S/H	
8	COLIMA	15-Fem.	+	+		+	
9	COLIMA	24-Mas.	+	+		+	+
10	COLIMA	46-Mas.	+	+		+	
11	JALISCO	47-Fem.	+	+		+	+
12	JALISCO	16-Mas.	+	+		+	+
13	JALISCO	63-Mas.	+	+		+	
14	JALISCO	13-Fem.	+	+		+	+
15	MICHOACAN	25-Fem.	ASINTOMATICO				
16	S.L.P.	36-Fem.	+	+		+	+
17	S.L.P.	45-Mas.	+	+		+	+
18	S.L.P.	45-Fem.	+	+		+	+
19	S.L.P.	40-Fem.	+	+		+	+
20	SINALOA	24-Fem.	+	+		+	
21	SINALOA	22-Fem.	+	+		+	
22	SINALOA	23-Fem.	+	+		+	
23	SINALOA	12-Fem.	+	+		+	
24	SINALOA	11-Fem.	+	+		+	
25	SINALOA	12-Fem.	+	+		+	
26	SINALOA	12-Fem.	+	+		+	
27	TABASCO	45-Fem.	+	+		+	+
28	TABASCO	S/H-Mas.				S/H	
29	TABASCO	26-Fem.	+	+		Diarrea	+
30	VERACRUZ	19-Fem.	+	+		+	

S/H = Sin historia clínica.

Fem. = Femenino

Mas. = Masculino

F = Fiebre.

D.R.O. = Dolor retroocular.

M / A = Mialgias y Artralgias

C. = Cefalea.

E. = Exantema.

TABLE 4 RESULTADOS DE LA TITULACION DE ANTICUERPOS
POR LA PRUEBA DE IHA.

# de suero	Días después del inicio de la enfermedad	ANTICUERPOS				Aislamiento
		Den-1	Den-2	Den-4	E E V	
1*	S/H	1280	20	40	< 10	NR
2*	S/H	1280	20	40	< 10	NR
3	3	160	320	1280	< 10	Neg.
	15	> 1280	1280	1280	< 10	
4	2	40	20	40	< 10	Neg.
	17	> 1280	1280	1280	< 10	
5	4	20	20	20	< 10	Neg.
	17	1280	1280	1280	< 10	
6	8	1280	1280	1280	< 10	NR
	20	1280	1280	1280	< 10	
7	1	1280	1280	1280	< 10	Neg.
	6	1280	1280	1280	< 10	
8	4	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	16	160	20	160	< 10	
9	2	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	14	< 10	< 10	< 10	< 10	
10	3	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	15	160	>1280	320	< 10	
11	5	20	20	320	< 10	NR
	15	320	160	>1280	< 10	
12	2	10	10	10	< 10	Den-1
	17	40	20	80	< 10	
13	3	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	14	320	160	1280	< 10	
14	1	< 10	< 10	< 10	< 10	Den-1
	17	80	10	80	< 10	
15	3	40	80	>1280	< 10	Neg.
	14	160	80	>1280	< 10	
16	8	< 10	< 10	< 10	< 10	NR
	21	160	20	40	< 10	
17	5	< 10	< 10	< 10	< 10	NR
	15	320	< 10	< 10	< 10	
18	2	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	17	160	80	80	< 10	
19	5	< 10	< 10	< 10	< 10	NR
	16	160	40	40	< 10	
20	5	640	320	>1280	< 10	NR
	20	> 1280	>1280	>1280	< 10	
21	15	> 1280	640	>1280	< 10	NR
	21	> 1280	640	>1280	< 10	
22	15	> 1280	>1280	>1280	< 10	NR
	21	> 1280	>1280	>1280	< 10	
23	9	> 1280	640	>1280	< 10	NR
	21	> 1280	>1280	>1280	< 10	
24	3	> 1280	>1280	>1280	< 10	Neg.
	17	> 1280	>1280	>1280	< 10	
25	9	> 1280	640	>1280	< 10	NR
	18	> 1280	>1280	>1280	< 10	
26	9	> 1280	640	>1280	< 10	NR
	20	> 1280	>1280	>1280	< 10	
27	3	40	10	80	< 10	Neg.
	17	640	20	>1280	< 10	
28	3	< 10	< 10	< 10	< 10	Den-4
	15	80	320	160	< 10	
29	1	< 10	< 10	< 10	< 10	Den-4
	15	320	160	> 1280	< 10	
30	1	< 10	< 10	< 10	< 10	Neg.
	10	10	< 10	> 1280	< 10	

S/H = Sin historia clínica.
NR = No revivido.

* = Muestras únicas.

TABLA # 5

CARACTERISTICAS DEL DESARROLLO DE PLACAS DE VIRUS DE DENGUE EN
CELULAS LLC - MK₂ EN BOTELLA.

SEROTIPO	CEPA	TIEMPO (días)	DILUCION	INOCULO (ml)	# DE PLACAS * (\bar{X})	DIAMETRO (mm)	LOG. UFP/ml
1	Hawaii	8-9	10^{-1}	0.3	153	2 - 3	3.58
2	NG-C	8-9	10^{-1}	0.3	161	3 - 4	3.60
3	H-87	8-9	10^{-1}	0.3	200	2 - 3	3.69
4	H-241	8-9	10^{-1}	0.3	118	2 - 3	3.46

* = Promedio de placas formadas en 7 experimentos.

TABLA # 6 CARACTERISTICAS DEL DESARROLLO DE PLACAS DE VIRUS DE DENGUE EN CELULAS LLC - MK₂ EN MICROPLACA.

SEROTIPO	CEPA	TIEMPO (dias)	DILUCION	INOCULO (ml)	# DE PLACAS* (\bar{X})	DIAMETRO (mm)	LOG. UFP/ml
1	HAWAII	5 - 6	10^{-1}	0.05	16	2 - 4	3.50
2	NG - C	5 - 6	10^{-1}	0.05	16	2 - 3	3.50
3	H - 87	5 - 6	10^{-1}	0.05	24	2 - 3	3.68
4	H - 241	6 - 7	10^{-1}	0.05	12	3 - 4	3.38

* = Promedio de placas formadas en 13 experimentos.

TABLA # 7 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS PLACAS
FORMADAS POR LOS VIRUS DEL DENGUE

SEROTIPO (CEPA)	CARACTERISTICAS
Den-1 (HAWAII)	Placas ovales, bien delimitadas, con un tamaño - aproximado de 2 a 3 mm. Fácilmente contables. Al microscopio se puede observar: restos celula- res, células muertas (sin teñir), algunas células vivas con cierto grado de ECP (de tipo sincicial).
Den-2 (NG - C)	Placas pequeñas (2 a 3 mm), muy bien delineadas, generalmente redondas. Fácilmente contables. Al microscopio se puede observar: restos celulares, células completas sin teñir (muertas) y células vivas con cierto grado de efecto citopático.
Den-3 (H - 87)	Placas redondas con bordes irregulares, muy abun- dantes, fácilmente contables, con un diámetro - aproximado de 3mm. Al microscopio se observa: células muertas y restos celulares. Las células teñidas muestran escaso ECP.
Den-4 (H - 241)	Placas amorfas, generalmente estrelladas, de ma- yor tamaño que las producidas por los otros sero- tipos, su diámetro varía entre 3 y 4 mm. Son - fácilmente contables. Al microscopio se observan acúmulos de células muertas, existen pocos restos celulares, predominando células muertas completas. El ECP observado es mínimo.

TABLA # 8 RESULTADOS DE LA TITULACION DE ANTICUERPOS POR LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION EN MICROPLACA

# de Muestra	ANTIGENOS			
	Den - 1	Den - 2	Den - 3	Den - 4
1	640	10	10	20
2	320	10	10	20
3	40 / 320	40 / 80	20 / 40	160 / 160
4	80 / 640	10 / 20	10 / 20	40 / 40
5	20 / 640	10 / 20	10 / 20	20 / 40
6	320 / 320	80 / 80	40 / 80	640 / 640
7	160 / 160	80 / 80	10 / 10	640 / 640
8	10 / 80	10 / 10	10 / 10	10 / 40
9	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 20
10	10 / 40	10 / 640	10 / 20	10 / 40
11	20 / 40	10 / 40	10 / 10	80 / 640
12	10 / 80	10 / 10	10 / 10	10 / 20
13	40 / 160	10 / 40	10 / 20	20 / 640
14	10 / 160	10 / 10	10 / 10	10 / 20
15	20 / 40	20 / 20	10 / 20	640 / 640
16	10 / 80	10 / 20	10 / 10	10 / 20
17	10 / 160	10 / 10	10 / 10	10 / 10
18	10 / 80	10 / 20	10 / 10	10 / 20
19	10 / 80	10 / 10	10 / 10	10 / 20
20	160 / 160	40 / 160	20 / 20	640 / 640
21	160 / 320	20 / 20	20 / 20	160 / 640
22	80 / 160	20 / 40	10 / 10	80 / 640
23	80 / 640	40 / 40	10 / 10	160 / 640
24	80 / 160	20 / 20	10 / 20	80 / 320
25	40 / 160	10 / 10	10 / 10	80 / 320
26	40 / 160	20 / 40	10 / 10	80 / 640
27	40 / 160	10 / 20	10 / 20	40 / 640
28	10 / 20	10 / 20	10 / 20	10 / 320
29	10 / 80	10 / 40	10 / 10	10 / 640
30	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 320

Muestra fase aguda/Muestra fase convalesciente.

El título se reporta como el recíproco de la dilución que causa el 50% de reducción en la formación de placas.

DISCUSSION

La titulación del antígeno es necesaria para poder establecer los pH's óptimos de hemaglutinación de los diferentes serotipos de virus del Dengue.

Como se puede observar los rangos de pH son restringidos y característicos para cada serotipo.

El antígeno de Dengue - 3 no se obtuvo, debido a que no se contaba con semilla para la inoculación de ratones lactantes.

Comprobamos la especificidad de nuestros antígenos al retarlos con sueros homólogos; el mayor título se obtuvo entre antígenos y anticuerpos correspondientes, pero se puede observar que hay cierta reactividad cruzada entre los diferentes serotipos, también nos damos cuenta como con el antígeno de EEV no hay reactividad pues este pertenece a otro grupo, lo cual nos comprueba las relaciones antigénicas entre los miembros del mismo grupo. (Tabla # 2)

El número de muestras se seleccionó de acuerdo a las posibilidades de trabajo en el laboratorio, así como: a) no mostraba títulos de IHA concluyentes, b) no se había logrado el aislamiento del virus y c) presentaban condiciones adecuadas para trabajarse (cantidad, apariencia y esterilidad).

El aislamiento en pacientes que presentan síntomas compatibles con la enfermedad debe intentarse en los primeros días de la enfermedad, también se realiza la determinación de anticuerpos en las muestras tanto de fase aguda como de convalescente.

Los Flavivirus poseen antígenos que reaccionan en un gran número de pruebas serológicas, dentro de las cuales se encuentran IHA, Fijación de complemento, Neutralización viral, Inmunofluorescencia, Radioinmunoensayo y ELISA.

En general, la IHA, la Inmunofluorescencia y los Inmunoensayos para IgG muestran extensa reactividad cruzada, mientras que la prueba de Fijación de Complemento es específica, pero la prueba de Neutralización es la más específica.

[22]

En la prueba de IHA las dos primeras muestras presentan una respuesta monotípica para Dengue - 1, es decir, el título elevado de anticuerpos es para un solo serotipo [11]; por ser muestras únicas no es posible concluir si se trata de una infección reciente o anterior. Esto refleja la importancia del envío temprano de las muestras, acompañadas de historia clínica, junto con la muestra de fase convalescente. Para diagnóstico, los sueros pareados colectados por lo menos de 14 - 21 días, deben probarse simultáneamente. Las muestras únicas

no son útiles para el serodiagnóstico.

Para interpretar los resultados obtenidos por la prueba de IHA nos basamos en los siguientes criterios:

I.- Muestra Negativa: No hay anticuerpos detectables.

II.- Positiva:

1.- Respuesta Primaria: (infección reciente)

a) Respuesta monotípica: Cambio de cuatro veces o más en el título de anticuerpos a un solo serotipo de Dengue, con cambio mínimo a otros antígenos de Dengue u otros Flavivirus.

b) Respuesta amplia a Flavivirus: Cambio de cuatro veces o más en el título de anticuerpos a más de un solo serotipo de Dengue, y a uno o más de otros Flavivirus; títulos no mayores de 1:320.

2.- Respuesta Secundaria:

a) Infección reciente: Cambio de cuatro veces o más en el título de anticuerpos en muestras pareadas a dos o más serotipos de Dengue y a uno o más Flavivirus; títulos mayores o iguales a 1:640.

b) Infección no necesariamente actual: Anticuerpos para Dengue y dos o más de otros Flavivirus en muestras de suero pareadas con títulos mayores o iguales a 1:640 en por lo menos una muestra, sin cambio de cuatro veces.

3.- Títulos estables: Títulos de 1:20 a 1:320 para uno o más Flavivirus sin incremento de cuatro veces que sugiera infección de alguna vez en el pasado pero no necesariamente actual y se considera negativo.

La prueba de Fijación de Complemento puede ayudar a la interpretación, un incremento de cuatro veces o títulos mayores o iguales de 1:64 indican infección actual.

III.- No Concluyentes:

Cambios en el título de 1:10 a 1:20 para uno o más antígenos de Dengue. Se requiere una muestra posterior a la tomada en convalecencia. [11]

De acuerdo a los parámetros anteriores, en el Cuadro # 4 se resumen las interpretaciones para los resultados obtenidos en la prueba de IHA.

CUADRO # 4 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA
DE I H A

# de Muestra	INTERPRETACION
1	Respuesta monotípica para Dengue tipo 1, infección reciente.
2	Respuesta monotípica para Dengue tipo 1, infección reciente.
3	Respuesta secundaria, infección reciente, serotipo (?).
4	Respuesta secundaria, infección reciente, serotipo (?).
5	Respuesta secundaria, infección reciente, serotipo (?).
6	Respuesta secundaria, infección no necesariamente actual.
7	Respuesta secundaria, infección no necesariamente actual.
8	Respuesta primaria de amplio espectro, serotipo (?).
9	Negativa.
10	Respuesta primaria para Dengue 1 y 4, y secundaria para Dengue tipo 2, serotipo infectante (?).
11	Respuesta primaria para Dengue 1 y 2, secundaria para Dengue 4, serotipo infectante (?).
12	Respuesta primaria de amplio espectro, serotipo infectante - Dengue 1 (aislamiento).
13	Respuesta primaria para Dengue 1 y 2, secundaria para Dengue 4, serotipo infectante (?).
14	Respuesta primaria para Dengue 1 y 4, serotipo infectante - Dengue 1 (aislamiento).
15	Respuesta primaria para Dengue 1, infección actual Dengue 4.
16	Respuesta primaria monotípica para Dengue 1.
17	Respuesta primaria monotípica para Dengue 1.
18	Respuesta primaria de amplio espectro.
19	Respuesta primaria monotípica para Dengue 1.
20	Respuesta secundaria, infección actual.
21	Respuesta secundaria, infección actual.
22	Respuesta secundaria, infección actual.
23	Respuesta secundaria, infección actual.

CUADRO # 4 Continuación.

# de Muestra	INTERPRETACION
24	Respuesta secundaria, infección actual.
25	Respuesta secundaria, infección actual.
26	Respuesta secundaria, infección actual.
27	Respuesta secundaria para Dengue 1 y 4.
28	Respuesta primaria de amplio espectro, serotipo infectante -- Dengue 4 (aislamiento).
29	Respuesta primaria para Dengue 1 y 2, secundaria para Dengue 4, infección reciente, serotipo infectante Dengue 4 (aisla- miento).
30	Respuesta secundaria, infección reciente, serotipo infectante Dengue 4.

Con solo la prueba de IHA, hasta el momento la identificación del serotipo infectante no se ha logrado establecer debido a la gran reactividad cruzada que existe entre los virus del Dengue.

Para poder determinar la identidad del virus infectante, se procedió a -- efectuar la prueba de Neutralización en placa, la cual presenta mayores ventajas como son: un alto grado de especificidad y confiabilidad; además de la -- capacidad de detectar cepas variantes de virus, basada en la diferente morfología de las placas, sensibilidad a la temperatura u otras características de -- crecimiento. [2]

La prueba de Neutralización mide solamente la reacción entre los determinantes antigénicos en la superficie del virión y los anticuerpos correspondientes.

Para los Flavivirus la reacción involucra solamente la proteína V 3 o E. [18, 32, 39]

Los procedimientos que no dependen de la infectividad viral, tales como -- Fijación de Complemento, Inmunofluorescencia y Radioinmunoprecipitación detectan reacciones que involucran varios antígenos proteicos estructurales y no -- estructurales, y sus anticuerpos correspondientes. [39]

Para estandarizar la prueba de Neutralización fué necesario en primer lugar determinar las características de desarrollo de placas por virus del Dengue en células LLC - MK₂, tanto en botella como en microplaca. La dilución de -- virus utilizada fue baja debido a una descompostura en las unidades de congelamiento.

La estandarización de la formación de placas utilizando microplacas fue -- necesaria debido a la gran cantidad de material requerido para el desarrollo de la prueba en botella.

Como puede observarse, existe correlación entre la formación de placas -- tanto en botella como en microplaca, las variaciones observadas se deben a la superficie disponible para la replicación viral (botella = 25 cm²; pozo de microplaca = 2 cm²). Dependiendo del virus en cuestión, el máximo número de placas que pueden contarse con seguridad en pozos, promedian alrededor de 15 a 30. [11, 12, 13, 24, 37, 39]

Los distintos serotipos de virus del Dengue presentan diferencias en las -- características morfológicas de las placas formadas, que pueden servir para su identificación. (Tabla # 7) [2, 19, 31, 33, 34, 44, 46]

De acuerdo a los resultados de la Tabla # 8, podemos establecer las siguientes interpretaciones para cada uno de los sueros trabajados por la prueba de -- Neutralización.

CUADRO # 5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS PARA LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION EN PLACA

# de la Muestra	INTERPRETACION
1	Respuesta monotípica para Dengue - 1.
2	Respuesta monotípica para Dengue - 1.
3	Dengue - 1, Respuesta secundaria.
4	Dengue - 1, Respuesta secundaria.
5	Dengue - 1, Respuesta secundaria.
6	Dengue 1 y/o 4, Respuesta secundaria.
7	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
8	Dengue - 1, Respuesta primaria.
9	Negativo.
10	Dengue - 2, Respuesta secundaria.
11	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
12	Dengue - 1, Respuesta primaria.
13	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
14	Dengue - 1, Respuesta primaria.
15	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
16	Dengue - 1, Respuesta monotípica primaria.
17	Dengue - 1, Respuesta monotípica primaria.
18	Dengue - 1, Respuesta monotípica primaria.
19	Dengue - 1, Respuesta monotípica primaria.
20	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
21	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
22	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
23	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
24	Dengue - 4, Respuesta secundaria.

CUADRO # 5 Continuación.

# de la Muestra	INTERPRETACION
25	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
26	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
27	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
28	Dengue - 4, Respuesta primaria.
29	Dengue - 4, Respuesta secundaria.
30	Dengue - 4, Respuesta secundaria.

La prueba de Neutralización resultó ser más específica que la prueba de IHA. La combinación de éstas dos pruebas serológicas nos permite detectar el tipo de respuesta inmune y llegar a la identificación del serotipo de virus del Dengue infectante, cuando por aislamiento no se ha podido determinar.

CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Por razones relacionadas al número y a la especificidad de los --
antígenos involucrados en cada procedimiento de prueba, la prueba -
de Neutralización en Microplaca resultó ser más específica y confia-
ble que la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.
- 2.- La prueba de Neutralización en Microplaca da resultados reproducí-
bles y puede establecerse como prueba de rutina en los laboratorios
de diagnóstico virológico.
- 3.- Experimentalmente no se comprobó la actividad actual de Dengue - 3
en las muestras trabajadas.
- 4.- El predominio de respuestas secundarias en las muestras trabajadas-
es indicativo de que es posible el desarrollo de la forma severa de
la enfermedad en éstas personas y posiblemente en un gran número de
personas en nuestro país.
- 5.- Los serotipos de virus del Dengue que predominaron fueron Dengue -
tipo 1 y Dengue tipo 4.

A P E N D I C E S

VII.- A P E N D I C E S

APENDICE I

I.O PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO

PREPARACION DEL ANTIGENO DE DENGUE PARA LA PRUEBA DE
INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION POR LA TECNICA DE SACAROSA/ACETONA

A. Cerebros de ratones infectados:

1.- Se inoculan ratones lactantes (de 1 a 2 días de edad) por vía intra-cerebral con 0.02 ml de una suspensión de cerebros de ratones infectados. Esta suspensión es una dilución 10^{-2} ó 10^{-3} preparada en PBS pH= 7.4 adicionada con 10% de suero fetal normal de ternera o conejo.

2.- Se examinan dos veces diariamente a los ratones inoculados en busca de signos de enfermedad compatibles con Dengue y haya algunos moribundos, entonces se sacrifican.

3.- Los ratones se desinfectan con alcohol al 70% y se dejan secar. Se extraen los cerebros asépticamente y se colocan en un recipiente en baño de hielo seco con alcohol, para que se congelen rápidamente.

4.- Los cerebros de ratón congelados pueden guardarse a -70°C hasta el día de preparación del antígeno.

5.- De manera similar se obtienen cerebros de ratones normales de la misma edad.

B. Preparación del antígeno:

El antígeno se prepara en un gabinete de seguridad con presión negativa.

1.- Se toma y se anota el peso combinado del recipiente y los cerebros-- que contiene.

2.- Se dejan descongelar un poco los cerebros, lo suficiente para poder-- pasarlos a un homogeneizador hermético, previamente enfriado.

3.- Se pesa nuevamente el recipiente en donde se guardaban los cerebros y por diferencia se calcula el peso de éstos.

4.- Se agregan 4 volúmenes de solución acuosa de sacarosa al 8.5%. Se-- homogeneizan los cerebros con tres ciclos de un minuto permitiendo que el mate-- rial sedimente entre ciclo y ciclo.

5.- Se agrega el homogeneizado cerebral a 20 volúmenes de acetona fría, en proporción de 9 ml del primero para 180 ml del segundo. Se ponen los 180ml de acetona en frascos de centrifugación de 250 ml, colocados en un baño de hie-- lo picado. Con una jeringa de 10 ml provista de una aguja calibre 18, se va -- agregando lentamente el homogeneizado a la acetona, la cual se mantiene en agi-- tación.

6.- Mantener los frascos en refrigeración durante una hora.

7.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

8.- Aspirar el sobrenadante a un frasco de succión con solución de hipo-- clorito. Como medida de precaución se debe instalar otro frasco de succión -- provisto de algodón, entre el primero y la bomba de vacío. Agregar 180 ml de acetona fría a cada botella. Romper y pulverizar el sedimento con un émbolo -- de teflón.

9.- Mantener los frascos en frío durante dos horas y media.

10.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

11.- Utilizando la bomba de vacío, pasar la acetona sobrenadante a un -- recipiente con hipoclorito. Agregando pequeños volúmenes de acetona fresca y fría se van reuniendo todos los sedimentos en un solo frasco de centrifugación -- de 250 ml.

12.- Centrifugar a 1500 rpm, durante 5 minutos a 4°C.

13.- Se succiona nuevamente la acetona a un recipiente con hipoclorito.

14.- Añadir perlas de vidrio al sedimento y distribuirlo en una capa fina sobre el interior del frasco por medio de una rotación horizontal lenta.

15.- Desechar el sedimento utilizando la bomba de vacío. El frasco se coloca en un baño de hielo picado. Por lo general el proceso de desecación dura aproximadamente una hora.

16.- Cuando el antígeno está perfectamente seco se aplican unas pinzas homeostáticas al tubo de goma que va al frasco del antígeno y se desconecta la bomba. Se coloca en un frasco una solución salina boratada pH = 9 estéril en cantidad igual al 40% del volumen original del homogeneizado cerebral. Al extremo del tubo de goma se coloca una pipeta cuya punta se sumerge dentro de la solución salina, la cual se transfiere al frasco del antígeno abriendo las pinzas homeostáticas. Se quita el tapón y se reemplaza con otro sin orificio, que se asegura bien con cinta adhesiva. Agitar el frasco vigorosamente por unos cuantos minutos y dejarlo hasta el día siguiente a 4°C, para que se rehidrate completamente.

17.- Al día siguiente centrifugar la suspensión a 10,000 rpm durante 60 minutos a 4°C.

18.- Se retira el sobrenadante, se mide y se le agrega tris 1M (preparado en 0.85% de NaCl), en cantidad adecuada para una concentración final de 0.1M del tris. El antígeno se prueba por Hemaglutinación y Fijación de complemento. Si las pruebas son satisfactorias se procede a inactivarlo.

19.- Se prepara la beta - propiolactona al 1% en solución salina boratada pH = 9 y se agrega al antígeno para obtener una concentración final de 0.1%. Sacudir bien y dejar a 4°C durante 4 días, agitando dos veces diarias para mezclar.

NOTA: La acetona se descontamina agregándole más hipoclorito y dejándola en reposo durante 48 hrs antes de desecharla.

Tripsina, solución stock al 10%.

Tripsina cruda (1:300) 10.0 g

PBS libre de Mg²⁺ y Ca²⁺ 100 ml

Mezclar por agitación 10 minutos a 4°C. Centrifugar la solución durante una hora a 10,000 g. Esterilizar por filtración. Separar y congelar en alícuotas a - 20°C.

I.I PREPARACION DE SOLUCIONES

1.- Acido Bórico.

Acido bórico	30.92 g
Agua destilada caliente	700 ml
Agua destilada cbp.	1000 ml

2.- Acido cítrico - dextrosa (ACD).

Citrato sódico	11.26 g
Acido cítrico	4.0 g
Dextrosa	11.0 g
Agua destilada cbp.	500 ml

Esterilizar en autoclave a 10 lbs de presión durante 10 min.

3.- Albúmina bovina 4% (fracción V) (BABS).

Albúmina bovina	4.0 g
Borato salino pH = 9	100 ml

Esterilizar por filtración.

4.- Alsever's

Dextrosa	20.5 g
Cloruro de sodio	4.2 g
Acido cítrico	0.55 g
Citrato de sodio	8.0 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 10 lbs de presión durante 10 min.

5.- Antibióticos.

Penicilina G sódica 10,000,000 U	10 frascos
Sulfato de estreptomocina 5 g	10 frascos

Se disuelve cada frasco por separado en 10 ml de agua estéril, se mezclan todos en un matraz en condiciones de esterilidad, se afora a 1000 ml. Se distribuye en alícuotas de 10 ml y se conserva en congelación.

- 6.- Bicarbonato de sodio al 7.5%
Bicarbonato de sodio 7.5 g
Agua bidestilada 100 ml
Esterilizar por filtración.
- 7.- Borato salino pH = 9
Cloruro de sodio 1.5 M 80 ml
Acido bórico 0.5 M 100 ml
Hidróxido de sodio 1.0 N 24 ml
Agua destilada cbp. 1000 ml
- 8.- Cloruro de sodio 0.85%
Cloruro de sodio 8.5 g
Agua bidestilada 1000 ml
- 9.- Cloruro de sodio 1.5 M
Cloruro de sodio 87.68 g
Agua bidestilada 1000 ml
- 10.- DEAE - dextrán 2%
DEAE - dextrán 2.0 g
Agua bidestilada 100 ml
- 11.- Dextrosa - Gelatina - Veronal (DGV)
Barbital (veronal) 0.58 g
Gelatina 0.60 g
Barbital sódico 0.38 g
Cloruro de calcio anhidro 0.02 g
Sulfato de magnesio 0.12 g
Cloruro de sodio 8.5 g
Dextrosa 10.0 g
Agua destilada cbp. 1000 ml
El barbital y la gelatina son disueltos en 250 ml de agua caliente. Esterilizar por autoclave a 10 lbs de presión durante 10 minutos.

- 12.- Fosfato de sodio dibásico 2.0 M
 Fosfato de sodio dibásico (anhidro) 283.96 g
 Agua destilada 1000 ml
- 13.- Fosfato de sodio monobásico 2.0 M
 Fosfato de sodio monobásico 276.02 g
 Agua destilada 1000 ml
- 14.- Fosfato de sodio monobásico 0.2 M - Cloruro de sodio 0.15 M
 Cloruro de sodio 1.5 M 100 ml
 Fosfato de sodio monobásico 2.0 M 100 ml
 Agua destilada 800 ml
- 15.- Fosfato de sodio dibásico 0.2 M - Cloruro de sodio 0.15 M
 Cloruro de sodio 1.5 M 100 ml
 Fosfato de sodio dibásico 2.0 M 100 ml
 Agua destilada 800 ml
- 16.- Tabla de valores de pH (Buffers para la prueba de IHA)

Na_2HPO_4 0.2 M - NaCl 0.15 M	NaH_2PO_4 0.2 M - NaCl 0.15 M	pH
12.5 ml	87.5 ml	6.0
22.0 ml	78.0 ml	6.2
32.0 ml	68.0 ml	6.4
45.0 ml	55.0 ml	6.6
55.0 ml	45.0 ml	6.8
64.0 ml	36.0 ml	7.0

El pH es obtenido por mezcla de volúmenes iguales de borato salino
 pH = 9 y el buffer elegido.

- 17.- L - glutamina 3%
L - glutamina 3.0 g
Agua bidestilada 100 ml
Esterilizar por filtración.
- 18.- HEPES, solución stock 1.0 M
HEPES 23.83 g
Agua bidestilada 100 ml
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1 N. Esterilizar por filtración.
- 19.- Kaolín al 25%
Kaolín, lavado ácido 25.0 g
Borato salino pH = 9 100 ml
Mantener en agitación durante 30 min.
- 20.- PBS, libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} , pH = 7.5
Cloruro de sodio 8.0 g
Cloruro de potasio 0.2 g
Fosfato de sodio dibásico 0.91 g
Fosfato de potasio monobásico 0.12 g
Agua bidestilada 1000 ml
Esterilizar por autoclave a 15 lbs durante 15 min.
- 21.- Rojo neutro 1:300
Rojo neutro 1.0 g
Agua bidestilada 300 ml
Esterilizar por autoclave a 15 lfs durante 15 min.
- 22.- Medio de crecimiento para células LLC - MK₂
Medio 199 10 X en solución salina de Hank's 100 ml
Penicilina / estreptomycin 100 X 15 ml
Bicarbonato de sodio 4.4% 25 ml
Glutamina 3% 10 ml
HEPES 10 ml

Suero fetal bovino (inactivado a 56°C 30 min) 80 ml
Agua destilada y desionizada cbp. 1000 ml
Se mezclan primeramente el medio 199 y los antibióticos, posteriormente se diluye hasta 500 ml y se continúa mezclando los demás reactivos. Se realiza en condiciones de esterilidad.

23.- Medio de mantenimiento para células LLC - MK₂

Medio 199 10X en solución salina de Hank's 100 ml
Penicilina / Estreptomicina (100X) 15 ml
Bicarbonato de sodio 4.4 % 50 ml
HEPES 10 ml
Agua destilada y desionizada cbp. 1000 ml

24.- Primera capa de agar.

a) Porción de agar:

Agar Difco purificado 1.0 g
Agua bidestilada 74.0 ml

b) Porción de nutrientes:

Medio 199 en solución salina de Hank's sin bicarbonato de sodio y sin rojo de fenol (10 X) 10.0 ml
Suero fetal bovino (inactivado) 10.0 ml
Bicarbonato de sodio 7.5% 4.0 ml
DEAE - dextrán 2% 1.0 ml
Vitaminas en medio basal Eagle (100 X) 0.5 ml
Aminoácidos en medio basal Eagle (100 X) 0.5 ml
Penicilina / Estreptomicina 0.1 ml

Se esteriliza la porción de agar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 min. Se mezclan los ingredientes de la porción de nutrientes en el orden descrito, evitando la formación de precipitados. Se combinan la porción de agar con la porción de nutrientes a 44°C.

25.- Segunda capa de agar.

Agar Difco purificado 1.0 g.
Cloruro de sodio 0.85% 96.0 ml

Esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión durante
15 min.

Dejar enfriar (aproximadamente a 44°C) y adicionar en
condiciones de esterilidad 4 ml de una solución stock
estéril de rojo neutro 1:300.

APENDICE II

PROPAGACION DE CELULAS LLC - MK₂ A MICROPLACA

- 1.- De una botella de 25 cm² de superficie con una monocapa confluyente de células LLC - MK₂ se realiza el pase a microplacas comenzando por remover el medio de cultivo.
- 2.- Se lava la monocapa con PBS pH = 7.5.
- 3.- Se tripsiniza la monocapa (con 1.5 ml de tripsina al 0.25%).
- 4.- Se resuspenden las células con 5 ml de medio, se centrifugan y se prepara una suspensión de 240,000 células/ml.
- 5.- Se agrega a cada uno de los pozos de la microplaca un mililitro de ésta suspensión.
- 6.- Después de 48 horas de incubación a 36 - 37°C en una incubadora de atmósfera húmeda con 5% de CO₂, se obtiene una monocapa uniforme.

Estas microplacas son utilizadas en la prueba de Neutralización.

APENDICE III

ADAPTACION Y PROPAGACION DE LOS VIRUS DEL DENGUE EN CULTIVO CELULAR

- 1.- Se inoculan células TRA - 284 con 0.25 ml de muestra (suero estéril o virus a propagar).
- 2.- Se montan tubos controles:
 - a) Positivos: Se inocula un tubo con cualquier serotipo de virus del Dengue.
 - b) Negativos: Se incuba un tubo de cultivo celular sin inocular.
- 3.- Se incuban los tubos a 28°C durante 10 días.* Se revisan diariamente en busca de que no exista contaminación.** Las células no deben despegarse, si esto sucede se diluye el suero de la muestra a probar.
- 4.- Después de 10 días se realiza el siguiente procedimiento:

Los tubos se agitan vigorosamente y se centrifugan a 4°C a 1,500 rpm durante 10 minutos.
- 5.- Se descarta aproximadamente 1 ml de cada tubo con una pipeta Pasteur.
- 6.- Se resuspende y se procede a montar laminillas para inmunofluorescencia directa e indirecta.

* El virus de Dengue provoca efecto citopático en ciertas líneas celulares, como son las derivadas de mosquito (AP - 61, TRA - 284). El efecto citopático es de tipo sincicial el cual puede ser visto después del 4° día de inoculación.

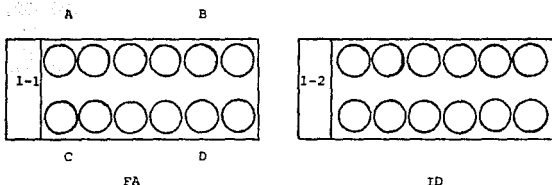
** La contaminación bacteriana puede ser eliminada de las muestras por dilución en 1 ó 2 ml de medio y filtrado a través de una membrana de 0.22. Las membranas se tratan con SFT 10% en PBS pH = 7.2 para prevenir la pérdida de virus.

APENDICE IV

PRUEBA DE INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA

Se parte de una muestra que ha sido previamente inoculada en mosquito, --
ratón lactante o en cultivo celular. Apéndice III

Se procede a montar las laminillas de acuerdo a los siguientes esquemas.



1.- En los tres primeros pozos de la laminilla FA (posición A) se monta un control positivo (virus de Dengue prototipo), en los tres siguientes pozos (posición B) se monta un control negativo, el cual se prepara con el cultivo -- celular no infectado. En los pozos restantes (C y D) se montan las muestras - problema. Todas las muestras se colocan por capilaridad. Simultáneamente se monta una laminilla de identificación (ID) en donde la muestra problema se colo ca en todos los pozos.

2.- Se dejan secar al aire o en el flujo laminar (aproximadamente 30 mi-
nutos). Posteriormente la laminilla de identificación se guarda en refrigera-
ción. A la laminilla FA se le continúa el siguiente procedimiento:

- 3.- Se fija con acetona a 4°C durante 10 minutos.
- 4.- Se deja secar al aire.
- 5.- Se agrega el conjugado fluoresceína - anti-Flavivirus a cada pozo y se incuba a 37°C en cámara húmeda.

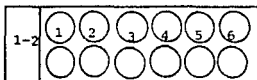
6.- Se lava con PBS pH = 7.5 durante 10 minutos con agitación suave y -- constante.

7.- Se monta la laminilla para realizar la lectura (solución de PBS - - glicerina 10%).

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se seleccionan las muestras positivas, se sacan de refrigeración las lami-
nillas de identificación y se colocan a temperatura ambiente.

1.- Se preparan los anticuerpos monoclonales, cada anticuerpo se diluye
1:10 en PBS pH = 7.5 excepto los anticuerpos para Flavivirus, los cuales son di-
luídos 1:100, y se agrega una gota a cada uno de los pozos como se muestra en -
la siguiente figura:



- 1.- Anticuerpos contra Flavivirus
- 2.- Control Negativo
- 3.- Anticuerpos contra Dengue - 1
- 4.- Anticuerpos contra Dengue - 2
- 5.- Anticuerpos contra Dengue - 3
- 6.- Anticuerpos contra Dengue - 4

- 2.- Se incuba a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- 3.- Se lava con agitación suave durante 10 min.
- 4.- Se agrega el conjugado fluoresceína - anti-IgG humana (diluido pre-
viamente 1:60).
- 5.- Se lava durante 10 minutos con agitación.
- 6.- Se incuba a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- 7.- Se monta y se realiza la lectura.

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

- a) **POSITIVO:** Fluorescencia en citoplasma con el área nuclear oscura en las células de la preparación.
- b) **NEGATIVO:** Ausencia de fluorescencia específica en las células.
- c) **NO ESPECIFICA:** Artefactos fluorescentes en todo el campo.

BIBLIOGRAFIA

VIII.-

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andrews, B. S., Peters, C. J., et al: Replication of Dengue and Junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. Inf. and Imm., 20 (3): 776 - 781 (1979).
- 2.- Bancroft, W. H., McCown, J. M., Lago, P. M., Brandt, W. E. and Rusell P. K.: Identification of Dengue viruses from the Caribbean by Plaque - Reduction Neutralization Test. In Dengue in the Caribbean -- 1977. PAHO, Sci. Pub., 375: 173 - 178 (1979)
- 3.- Bravo, J. R.: Factores de Riesgo Individual en la FHD/DSS. Evidencia epidemiológica. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán (1987).
- 4.- Bojalil, L. F., Rodríguez, M., et al: Microbiología Médica. Francisco Méndez Ed. (1982).
- 5.- Brandt, W. E., McCown, J. M., Gentry, M. K. and Rusell, P. K.: Infection enhancement of Dengue type 2 virus in U - 937 human monocyte cell line by antibodies to Flavivirus cross - reactive determinants. Inf. and Imm., 36 (3): 1036 - 1041 (1982).
- 6.- C. D. C.: Dengue - México. M. M. W. R., 31: 402 - 404 (1979).
- 7.- C. D. C.: Dengue - Cuba. M. M. W. R., 30 (26): 317 (1981).
- 8.- C. D. C.: Dengue - México. M. M. W. R., 33 (15): 203 - 210 (1984).

- 9.- C. D. C.: Dengue - Américas. M. M. W. R., 33 (23): 327 - 328 (1984).
- 10.- C. D. C.: Imported Dengue Fever U. S.. M. M. W. R., 34 (31): 488 - 489 (1985).
- 11.- C. D. C. PAHO: Dengue Diagnostic Laboratory Procedures for the -- Américas: A Manual. C. D. C. - PAHO. (1981).
- 12.- Chapell, W., Charles, H. et al: Comparison of three methods used - to isolate Dengue type 2. Appl. Microbiol., 22 (6): 1100 - 1103 - (1971).
- 13.- Cooper, P. D.: The plaque assay of animal viruses. Advan. Virus - Res., 8: 319 - 378 (1962).
- 14.- Craig, W., Melnick, J.: Mechanism of enhancement of virus plaques by cationic polymers. Jour. of Virol., 2 (4): 267 - 274 (1968).
- 15.- Craig, W., Morales, F., Powell, J. and Melnick, J.: Plaque enhance- ment of enterovirus by magnesium chloride, cysteine and pancreatin. Jour. Bacteriol., 91: 1932 - 1935 (1966).
- 16.- Daughaday, C. C., Brandt, W. E., McCown, J. M. and Russell, P. K.: Evidence for two mechanisms of Dengue virus infection of adherent - human monocytes: Trypsin - Sensitive virus receptors and Trypsin - Resistant Immune complex receptors. Inf. and Imm., 32 (2): 469 - 473 (1981).
- 17.- Della - Porta, A. J. and Westaway E. G.: Immune response in rabbits to virion and nonvirion antigens of the Flavivirus. Kunjin. Inf. and Imm., 15: 874 - 882 (1977).
- 18.- Dennis, W.: The molecular biology and epidemiology of Dengue virus. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).

- 19.- Earley, E., Peralta, P. H. and Johnson, K. M.: Plaque Neutralization method for Arboviruses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125: 741 747 (1967).
- 20.- Esparza, J.: The Dengue component of the WHO programme for vaccine development. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 21.- Esparza, J.: Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. A summary of the world situation. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 22.- Fenner, F.: Virología Médica. La Prensa Médica Mexicana. (1984).
- 23.- Fields, B. N., et al: Virology. Raven Press New York (1985).
- 24.- Georgiades, J., Stim, T. B., et al: Dengue virus plaque formation in Rhesus monkey kidney cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118 (2): 385 - 388 (1965)
- 25.- Halstead, S. B.: Dengue Haemorrhagic Fever a Public Health problem and a field for research. Bulletin of the WHO., 58 (1): 1 - 21 (1980).
- 26.- Hunter, G. and Frye, W.: Manual de Medicina Tropical. La Prensa Médica Mexicana. (1973).
- 27.- Inouye, S., Matsuno, S., et al: Haemagglutination - inhibiting immunoglobulin A antibody in the serum of patient with Dengue haemorrhagic fever. Jap. J. Med. Sci. Biol., 33 (3): 181 - 184 (1980).
- 28.- Kenneth, H., Eckels, V., Harrison, P., et al: Dengue 2 vaccine preparation from small plaque virus clone. Inf. and Imm., 27 (10): 175 - 180 (1980).

- 28.- Keyla, B. F.: Some clinical data from the Dengue outbreak at Rio de Janeiro. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 29.- Kliks, S. C., Nisalak, A., et al: Evidence of different virulence in Dengue - 1 and Dengue - 2 serotypes. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 30.- Kouri, G., Guzmán, M.: Análisis Integral de la Epidemia Cubana. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 31.- Lennete, E., Schmidt, N.: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. American Public Health Association (1979)
- 32.- Loroño - Piño, A., Farfán - Alé, J. A.: Estudios sero - epidemiológicos sobre la fiebre por Dengue en Yucatán México 1984 - 1986. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán. (1987).
- 33.- Manning, J., Collins, J. K.: Effects of cell culture and laboratory conditions type 2 Dengue virus infectivity. J. Clin. Microbiol. 10 (2): 235 - 239 (1979).
- 34.- Matsumura, T. and Schesinger, W.: Studies on the nature of Dengue viruses. Estructure and Development of Dengue virus in Vero cells. Virology., 46 (2): 344 - 355 (1971).
- 35.- McCloud, T. G., Cardiff, R. D., Frandt, W. E., et al: Separation of Dengue strains on basis of a nonstructural antigen. Am. Jour. - Trop. Med. Hyg., 20 (6): 960 - 968 (1971)

- 36.- Nagai, K. and W. Mc Hammon.: Plaque studies with certain group B Arbovirus. I. Japanese B encephalitis virus strains on hamster kidney and chick embryo tissue culture. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 154 - 159 (1964).
- 37.- Nawa, M.: Development of a new cell system for the infectivity -- assay of Dengue viruses plaque-formation and virus growth of prototype and wild - type Dengue virus strains in newly established cell line. G. K. Microbiol. Immunol., 28 (7): 767 - 776 (1984).
- 38.- Nyven, J. M., O'Rourke.: Absence of leucocytes permissive to Dengue 2 virus in the acute phase of Dengue haemorrhagic fever. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28 (3): 570 - 576 (1979).
- 39.- Ong, S. B.: Plaque formation of Dengue viruses in LLC - MK₂ cell - cultures. S. E. Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth., 2 (2): 147 - 150 (1971).
- 40.- PAHO: Dengue in the Caribbean. Proceedings of a workshop held in Montego Bay, Jamaica. Sci. Publ. # 375 (1979).
- 41.- Piatkin, K., Krivoshein, Y.: Microbiologia. MIR Moscú, (1986).
- 42.- Quereshi, A. and Trent, D. J.: Group B Arbovirus structural and -- nonstructural antigens. II. Serologic specificity of solubilized intracellular viral proteins. Infect. Immun., 8: 993 - 999 (1973).
- 43.- Rosen, L. and Gubler, D.: The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23: 1153 - 1160 (1974).
- 44.- Russell, P. K. and McCown, J.: Comparison of Dengue 2 and Dengue 3 virus strains by Neutralization Test and identification of a sub -- type of Dengue 3. Am. J. Trop. Med. Hyg., 85 (1): 97 - 99 (1971).

- 45.- Russell, P. K., Nisalak, et al: A plaques reduction test for Dengue virus neutralizing antibodies. Jour. Immunol., 99 (2): 285 - 290 (1967).
- 46.- Russell, P. K., Nisalak, A., et al: Dengue virus identification by the plaques reduction neutralization test. Jour. Immunol., 99 (2): 291 - 296 (1967).
- 47.- Schesinger, R., Walter, et al: Clinical and serologic response of man to immunization with attenuated Dengue and Yellow fever viruses. Jour. Immunol., 77 (5): 352 - 364 (1956).
- 48.- Schulze, I. and Schlesinger, R. W.: Plaque assay of Dengue and -- other Group B Arthropod Borne Viruses under methyl cellulose over -- lay media. Virology, 19 (1): 40 - 48 (1963).
- 49.- Shapiro, D., Trent, D., et al: Comparison of the virion polipeptides of group B Arbovirus. Infect. Immun., 6: 206 - 209 (1972).
- 50.- Sepúlveda, A. J.: Situación actual del Dengue en México. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida, - Yucatán. (1987).
- 51.- Somnate, B., Oranut, V., et al: Demonstration of Dengue antibody - complexes on the surface of platelets from patients with Dengue -- haemorrhagic fever. Am. Jour. Trop. Med. Hyg., 28 (5): 881 - 884 (1979).
- 52.- Stollar, V.: Studies on the nature of Dengue viruses the structural proteins of type 2 Dengue virus. Virology, 39: 426 - 438 (1969).
- 53.- Thorn, G., Adams, R.: Medicina interna. Harrison, Tomo I. La Prensa Médica Mexicana. (1984).

- 54.- Tikki Pang: Pathogenesis of Dengue Haemorrhagic fever: Host -- immune response or virus? Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida, Yucatán. (1987).
- 55.- Tikki Pang: Molecular characterization of Dengue virus genomes. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida, Yucatán. (1987).
- 56.- Valdespino, J. L.: El Dengue que vino del sur. Actualidades Médicas., 13 (8): 35 - 40 (1982).
- 57.- Viktor, A., Bokish, M. D., et al: The potencial pathogenic role of complement in Dengue haemorrhagic shock syndrome. The New England Jour. of Med., 8: 996 - 1000 (1973).
- 58.- Westaway, E. G.: Proteins specified by group B Togaviruses in mammalian cells during productive infections. Virology, 51: 454 - 465 (1973).
- 59.- Westaway, E. G.: Assesment and application of a cell line from pig kidney for plaque assay and neutralization test with twelve group B arbovirus. Am. Jour. Epidemiol., 84 (3): 439 - 456 (1966).
- 60.- Westaway, E. G. and Reedman, B. M.: Proteins of the group B arbovirus. Kunjin. Jour. Virology, 4: 688 - 693 (1969).
- 61.- WHO: Guide for diagnosis, treatment and control of Dengue Haemorrhagic Fever. Technical advisory committee on Dengue Haemorrhagic fever for the South East Asian and Western Pacific Regions. (1980).
- 62.- Zúrate, M. L.: Serotipos circulantes en México. Reunión Internacional de Dengue y Fiebre Hemorrágica de Dengue. Mérida Yucatán (1987).