

38  
2 of



Universidad Nacional  
Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLAN

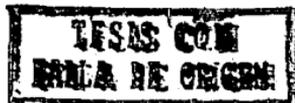
COMPARACION ENTRE LAS TECNICAS DE MAC-ELISA  
e INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (I.H.)  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE DENGUE  
EN MEXICO EN EL AÑO DE 1990.

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a  
CARLOS HERNANDEZ FRANCO

Director de Tesis:  
Q.B.P. Judith Martínez Zamitz

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1993





## **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

	HOJA
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- GENERALIDADES	
2.1 Historia.....	3
2.2 CARACTERISTICAS DEL AGENTE	
2.2.1 Clasificación.....	6
2.2.2 Características Microscópicas.....	8
2.2.3 Característica Antigénicas.....	13
2.2.4 Agente Etiológico.....	14
2.3 PATOGENESIS	
2.3.1 Enfermedad.....	16
2.3.2 Mecanismo de Transmisión (VECTORES).....	21
2.3.3 Periodo de Incubación y Cuadro Clínico.....	22
2.3.4 Mecanismo de Patogenicidad.....	27
2.4 DIAGNOSTICO	31
2.4.1 Diagnóstico Clínico Diferencial.....	32
2.4.2 Diagnóstico de Laboratorio.....	32
2.4.2a Métodos de Aislamiento.....	34
2.4.2b Métodos Serológicos.....	37
2.4.2c Otros Métodos Diagnósticos.....	
2.5 EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL	
2.5.1 Situación Presente en México.....	39
2.5.2 Distribución Geográfica.....	42
2.5.3 Medidas de Control.....	42
2.6 TRATAMIENTO.....	45
3.- OBJETIVOS.....	46
4.- MATERIAL Y METODOS.....	47
5.- RESULTADOS.....	61
6.- DISCUSION.....	73
7.- CONCLUSIONES.....	79
8.- APENDICE.....	80
9.- BIBLIOGRAFIA.....	85

## INDICE DE ABBREVIATURAS

1. A.C.M. Anticuerpos Monoclonales
2. C.D.C. Center for Diseases Control
3. C.I.D. Coagulación Intravascular Diseminada
4. D.S.S. Dengue con Síndrome de Shock
5. D.G.V. Dextrosa Gelatina Veronal
6. F.H.D. Fiebre Hemorrágica de Dengue
7. DEN-1 Dengue Serotipo 1  
DEN-2 Dengue Serotipo 2  
DEN-3 Dengue Serotipo 3  
DEN-4 Dengue Serotipo 4
8. I.H. Inhibición de la Hemaglutinación
9. I.N.D.R.E. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
10. I.C.T.V International Committe on Taxonomy of Viruses
11. MAC-ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay- Captura de IgM
12. O.M.S. Organización Mundial de la Salud
13. O.P.S. Organización Panamericana de la Salud
14. P.B.S. Solución Amortiguadora de Fosfatos
15. P.I.E. Periodo de Incubación Extrínseco
16. R.I.A. Radioinmunoensayo
17. R.P.M. Revoluciones Por Minuto

## 1. INTRODUCCION.

El Dengue es una de las enfermedades infecciosas de etiología viral que por sus características epidemiológicas y clínicas se ha convertido en una de las principales enfermedades que afectan a un gran número de personas principalmente en las regiones tropicales donde el clima es propicio para el desarrollo del vector, el mosquito *Aedes aegypti*.

En México el dengue presenta un patrón epidémico, caracterizado por su presencia la mayor parte del año en diferentes regiones del país, pero se presentan brotes que llegan a afectar a una o varias poblaciones de cada una de las regiones en donde el dengue es endémico, con manifestaciones clínicas clásicas (Dengue clásico), o con las llamadas formas severas de la enfermedad (Fiebre hemorrágica del dengue y Dengue con síndrome de choque) siendo estas últimas las de mayor importancia debido al daño que llegan a sufrir los individuos a los cuales afecta.

La detección oportuna y rápido diagnóstico de esta enfermedad en las regiones afectadas por Dengue permitiera establecer la estrategia que impida que el brote llegue a afectar a otras poblaciones y además de que las regiones ya afectadas cuenten con la ayuda necesaria que impida que se presenten casos de manifestaciones severas del Dengue.

Desde que el Dengue apareció en México en 1978 solo el laboratorio de Virología Diagnóstica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.) se encargaba del diagnóstico y estudio de esta enfermedad a nivel nacional siendo la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (I.H.) la prueba de rutina para detección de casos dengue. Existen otras técnicas alternativas como son: la Inmunofluorescencia, la Fijación de complemento, la Neutralización por reducción de placa; pero la sensibilidad y especificidad de estas técnicas esta por debajo de I.H. ó resultan ser demasiado

costosas para ser implementadas en el laboratorio como, es el caso de la técnica de radioinmunoensayo.

En el presente trabajo se pretende encontrar una alternativa al diagnóstico de dengue que como se menciono , la técnica de I.H. es la técnica de rutina para este proposito, se busca que esta técnica nos proporcione en menor tiempo la obtención de resultados, sea de mayor sensibilidad y especificidad y ser implementada en la mayor parte de los laboratorios regionales del país que esten afectados por el Dengue.

La técnica de ELISA recientemente desarrollada en el C.D.C de San Juan, Puerto Rico para la detección de anticuerpos IgM específicos contra dengue (MAC-ELISA), la convierten en una técnica, que por sus características la hacen ser la técnica que pueda sustituir a I.H. por lo cual se hara una comparación de ambas técnicas para determinar las ventajas que pueda ofrecer la técnica de (MAC-ELISA) sobre I.H.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 HISTORIA

El término dengue fue introducido del español a la literatura médica inglesa en los años de 1827-28 durante una epidemia en el Caribe, caracterizada por exantema y artralgias. Este término es una traducción de un dialecto asiático swahili: *denga dyenga* o *Ki denga pepa* que describe "un golpe súbito causado por un espíritu maligno". El nombre de *Knokkel-Kilirs* dado en Indonesia en 1780 un término que antecedió a lo que ahora conocemos como dengue, nombre que se aceptó oficialmente en 1869 por la "Royal College of Physicians" de Londres. (24)

La fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y dengue con síndrome de choque (DSS) fueron identificados por primera vez en Australia en 1827 y en Grecia en 1928. Algunas de las epidemias más grandes se desencadenaron en E.U.A. Australia, Grecia y Japón las cuales se presentaron a partir de 1920, en ellas hubo un gran número de individuos afectados. El cuadro clínico fue reconocido y estudiado en Manila en 1954 y en Tailandia en 1958 (Fiebre hemorrágica del Thai). Entre 1953-1964 la FHD fue descrita en la India, Malasia, Filipinas, Tailandia y Vietnam. A partir de entonces existió un considerable aumento en el reporte de casos principalmente en el sureste de Asia. (24)

El dengue en las Américas ha ido definiendo su identidad como un problema de salud pública, su evolución incierta dentro de la historia de las epidemias de la región se inicia con la importación tanto del vector como del agente, continuando con la lenta adaptación de estos a las condiciones locales, en forma paralela al desarrollo de las sociedades del continente. (21)

Los primeros datos sobre la presencia del dengue en la Américas se registraron en Filadelfia en 1790, posteriormente se reportó una epidemia en el Caribe 1827. Entre 1826 y 1828 se describe una gran epidemia, de algo semejante al dengue en el sur de los Estados Unidos y en los países del Caribe, adquiriendo en este brote el nombre con el cual es conocido hasta la fecha (19) .

Reaparece posteriormente en Texas en 1881-1885, se reporta en Cuba y de nuevo en Texas en 1897, invadió Puerto Rico en 1915 y Jamaica en 1917 y se diseminó en todo el Caribe en 1922.. Se desconoce el serotipo asociado a las primeras epidemias, los estudios serológicos en Panamá sugirieron que el dengue tipo 2 (DEN-2) fue el responsable del brote de 1941-42, aunque también estuvo presente el serotipo 3 (DEN-3) posteriormente se aisló el serotipo 2 en Trinidad (1953) (2,3,21,24,56,57)

#### PANORAMA HISTORICO EN MEXICO

Durante los años 50s se sabe que circuló por los menos un serotipo en México que dejó de hacerlo con el control del mosquito *Aedes aegypti* en la década de los 60, después de intensas campañas por erradicar al vector desde el año de 1947, durante esos años México se mantuvo libre de dengue. Posteriormente se presenta una epidemia en la región del Caribe en 1963 producida por el serotipo DEN-3. En 1977 se reportaron brotes asociados a los serotipos DEN-2 y DEN-3, en ese mismo año se introduce el serotipo DEN-1 en toda la región del Caribe, Sur y Centro América, para invadir México en 1978 (74).

En el año de 1978 el vector invade nuevamente a México, reportándose en ese mismo año los primeros casos en el sureste de México marcando el comienzo de la actividad de los flavivirus en nuestro país. Desde entonces la enfermedad presenta un patrón anual, con picos en los meses de lluvia, predominantemente

asociados con los serotipos DEN-1 y DEN-4; la mayoría de los casos cursaron con cuadro de dengue clásico aún cuando se notificaron muy pocos casos de complicaciones hemorrágicas (22).

De 1960 a 1962 se reportaron brotes en 19 estados del país, lográndose ese último año comprobar por aislamiento la circulación del serotipo 1. Su posterior circulación por el territorio nacional ocasionó grandes epidemias de dengue clásico. Ya en el año de 1983 se encontraban afectados 23 estados del país lográndose, aislar por primera ocasión los serotipos 1, 2 y 4 que circulaban en regiones con ecosistemas diversos (húmeda, tropical y de tipo desértico) y altitudes cada vez mayores (hasta 1800 metros snm). De los 1,250,000 casos que se han reportado en el continente Americano de 1980 a 1988, los países más afectados por el dengue son Colombia (7.7 %), Brasil (17.2 %), Cuba (34.2 %), Puerto Rico ( 4.5 %) y México (22 %), la amplia distribución de serotipos a lo largo de los últimos 20 años y el amplio mosaico de serotipos que han circulado han favorecido la presentación y desarrollo de epidemias a lo largo de la historia ( 21, 22).

## **2.2 - CARACTERISTICAS DEL AGENTE.**

### **2.2.1 CLASIFICACION**

El virus del dengue y sus cuatro serotipos, que anteriormente fueran clasificados en 1974 por el International Committee on Taxonomy of Viruses dentro del género flavivirus, *Familia Togaviridae* además de los géneros alfavirus, Pestivirus, y Rubivirus y varios miembros adicionales; recientemente ha sido reclasificado junto con los otros miembros de este género en la *Familia Flaviviridae*. Para esta reclasificación las principales razones que se adoptaron fueron las siguientes. (78)

1.- En las células infectadas por flavivirus no se ha detectado RNA<sub>m</sub> subgenómico de 26S que corresponde a la porción 3' del genoma que codifica para proteínas estructurales.(78)

2.- En sistemas de traducción libres de células el RNA de los flavivirus genera solo proteínas estructurales, mientras que el RNA genómico de los alfavirus genera proteínas no estructurales. (78)

3.- El tamaño de los Flavivirus es de aproximadamente 45 nm y el de los otros géneros 50-70 nm. (78)

Basados en estos criterios se creó la *Familia Flaviviridae* **cuadro No 1.** la que incluye a más de 60 virus y la cual fue aprobada por el ICTV en 1984, el prefijo de la familia fue derivado de *flavus* (amarillo) y refiere a la especie tipo, que es el virus de la fiebre amarilla ( 78)

Cuadro. 1

## CLASIFICACION

---

FAMILIA : *FLAVIVIRIDAE*

GENERO: *Flavivirus*

Fiebre Amarilla	Powassan
Alfuy	Río Bravo
Apoi	Rocio
Vampiro Dakar	Encefalitis de San Luis
DENGUE 1,2,3,4	Vampiro de Entebbe
Ilheus	Oeste del Nilo
Encefalitis Japonesa	Zika
Enfermedad del bosque Kyansanur	Uganda
Encefalitis del Valle de Murray	Usutu
Fiebre Hemorrágica de Omsk	44 Miembros mas

---

FUENTE: Westaway EO. *Flaviviridae*. *Intervirology* 24: 183-192 (1985)

El virus del dengue al ser igualmente un virus transmitido por artrópodos pertenece al grupo de los Arbovirus (Subgrupo B). El término arbovirus (del inglés arthropod-borne viruses) agrupa a los agentes causales de algunas enfermedades epidémicas y enzoóticas más importantes de la patología infecciosa de origen viral. (53).

Además de contar con morfología y estructura genómica similares, todos comparten determinantes antigénicos, lo cual dificulta la identificación de los miembros de esta familia por las técnicas serológicas clásicas. (53)

La relación de los denguevirus con otros flavivirus fue demostrada serológicamente en 1950 por Sabin, quien reportó reacción contra el virus del dengue en individuos convalescientes de fiebre amarilla, de encefalitis japonesa y de infección por el virus del Oeste del Nilo. (31, 61)

## 2.2.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

El virus del dengue tiene forma esférica, además de tener una nucleocápside icosaédrica o isométrica de 30 nm de diámetro, el virión completo mide aproximadamente 45-50 nm de diámetro. En forma similar a otros flavivirus, los viriones maduros consisten en un genoma de cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (con características de RNA mensajero), con un coeficiente de sedimentación de 42 S y con un peso molecular de 4 Kd. El RNA viral contiene aproximadamente 11 Kb, con un "Cap" en la región 5' y posiblemente no existe poliadenilación en el extremo 3'. El RNA del virus del dengue es infeccioso y puede ser traducido *in vitro* el genoma viral codifica para tres proteínas estructurales y para varias proteínas no estructurales. (77, 30)

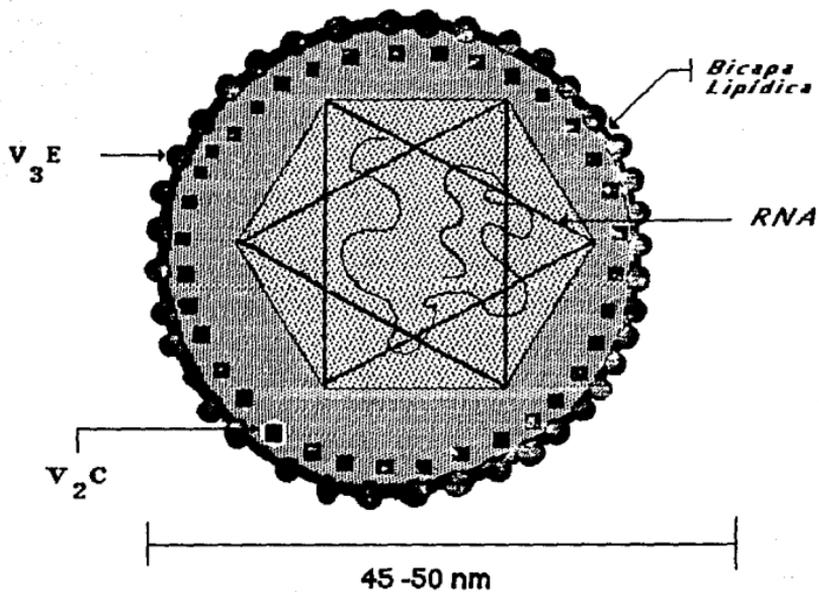
El virus del dengue está constituido por tres proteínas estructurales. La proteína de la nucleocápside V2 o C, de 14 Kd, es un polipéptido básico no glucosilado

asociado con el RNA viral, que da lugar a la nucleocápside, la cual está rodeada por una bicapa de lípidos con la cual interacciona una proteína glucosilada transmembranal denominada V3 o E (53-59 Kd). En esta proteína V3/E residen las principales actividades biológicas del virus como son: hemaglutinación, neutralización, unión a receptores celulares, neurotropismo, etc (73, 67).

Finalmente la proteína V1 o M (8 Kd) es un polipéptido no glucosilado, la localización de esta proteína de membrana dentro del virión no es clara, pero se postula que es una proteína integral de membrana que puede interactuar con la proteína V3/E, así como con el complejo RNA-proteína V2. se ha descrito una proteína adicional denominada pre-M que se piensa es el precursor glucosilado de la proteína de membrana V1/M en la **fig. 1** se representan la distribución de los componentes del virus. (68, 67)

Se desconoce el número exacto y la función de las proteínas no estructurales, sin embargo, recientemente varios grupos de investigación están estudiando la proteína NS (antígeno soluble fijador de complemento) y han demostrado que la administración pasiva de Anticuerpos Monoclonales (ACM) contra esta proteína protege a ratones infectados con el virus del dengue 2. Esta proteína esta glucosilada y se localiza en la membrana de las células infectadas, aunque también hay una forma soluble que se secreta al medio de cultivo. El cuadro **No. 2** muestra las principales proteínas estructurales y no estructurales de acuerdo a la nomenclatura aceptada para las proteínas de los flavivirus propuesta originalmente por Rice y col. (32, 54, 55).

La envoltura membranal de los denguevirus y flavivirus en general deriva de la célula hospedera de la cual emerge el virus, probablemente a partir de las membranas intracelulares del retículo endoplásmico. Esta envoltura se fusiona con las membranas de la célula hospedera durante la penetración del virión, probablemente promovida por un dominio de la proteína V1. (7)



**FIG. 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES Y PROTEINAS ESTRUCTURALES DE LOS DENGUEVIRUS.**

**CUADRO NO. 2  
PROTEINAS DE LOS DENGUEVIRUS Y SU FUNCION**

	<b>NOMBRE</b>	<b>GLICOSILACION</b>	<b>KDA</b>	<b>FUNCION</b>
PROTEINAS ESTRUCTURALES	V2/C	NO	13.5	Nucleocápside
	prM	SI	22	Precursor de la membrana
	V1/M	NO	8	Proteína de la membrana
	V3/E	SI*	51-60	Proteína de envoltura
	NS1	SI	48	¿ensamblaje viral?
PROTEINAS NO ESTRUCTURALES	NS2a	NO	20	¿procesadora de NS 1?
	NS2b	NO	14.5	desconocida
	NS3	NO	70	proteasa/
	NS4a	NO	16	desconocida
	NS4b	NO	27	desconocida
	NS5	NO	105	¿RNA polimerasa?

\* La proteína E está glicosilada en los denguevirus pero no en los demás flavivirus  
FUENTE: Henshal EA. The Dengue Viruses. Clin Microb. Rev. Vol. 3 No. 4:376-396 (1990)

## PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

Los hospederos naturales de los denguevirus descritos hasta la actualidad son los primates y los mosquitos, el hombre se considera un hospedero accidental, experimentalmente, los chimpancés, y los *Macacus rhesus*. Los gibones desarrollan viremias, infectan mosquitos y desarrollan respuesta inmune sin tener manifestaciones clínicas. En el laboratorio pueden replicarse en cultivos celulares, embrión de pollo, ratón lactante, conejos, cobayos y monos (*Macacus rhesus*). El virus del dengue se replica principalmente en células del sistema retículo endotelial (macrófagos). (16, 64).

El antígeno viral se ha detectado en el citoplasma de leucocitos mononucleares de la piel, bazo, ganglios linfáticos, sinusoides hepáticos, alveólos y corteza tímica. Este tropismo del virus del dengue por células del sistema fagocítico ha sido demostrado en monos y en experimentos *in vitro*. La replicación del virus se incrementa progresivamente en el tejido linfoide y en leucocitos y llega a su máximo cuando termina la fase de viremia. (16, 25)

Algunos serotipos del virus del dengue tienen marcado neurotropismo en ratón y presentan una patología similar a la de otros virus neurotrópicos, el virus DEN- 2 tiene neurotropismo en el ratón lactante y es capaz de replicarse en neuronas de ratón en cultivo; sin embargo, las cepas salvajes de dengue requieren frecuentemente de pases sucesivos en cerebro de ratón lactante antes de que se manifieste una completa neurovirulencia (36).

En infecciones por dengue en humanos se han informado una gran variedad de síndromes neurológicos tales como encefalitis, polineuritis, síndrome de Reye, etc. Sin embargo, no se ha demostrado claramente que el virus sea el responsable de esos síntomas (69).

### 2.2.3 CARACTERISTICAS ANTIGENICAS.

El virus del dengue antigénicamente comprende cuatro serotipos denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4, los primeros aislamientos los realizaron Sabin y Schlesinger en 1945, que distinguieron dos serotipos diferentes entonces llamados las cepas " *Hawaii* " y " *Nueva Guinea* ", que posteriormente se llamarían DEN-1 y DEN-2, los serotipos DEN-3 y DEN-4 se encontraron de cepas aisladas durante las epidemias de fiebre hemorrágica en las islas Filipinas (30, 59).

En los denguevirus existe un complejo distintivo el cual fue identificado por criterios clínicos, biológicos e inmunológicos, los primeros reportes sugieren de la existencia de determinantes antigénicos específicos del complejo, también se ha demostrado la presencia de un determinante antigénico específico del complejo en la proteína no estructural NS1 (antígeno soluble fijador de complemento). Usando un ensayo mejorado de neutralización por reducción de placa se demostró en forma concluyente que los denguevirus y sus serotipos constituyen un complejo único de virus. Este trabajo fue ampliado por otros investigadores que con anticuerpos monoclonales identificaron específicamente un complejo de epítomos. Puesto que la FHD y DSS han sido asociados únicamente con reacciones inmunes dentro del complejo dengue, estos determinantes antigénicos pueden jugar un papel importante en la inmunopatología de la enfermedad. (17, 30, 50, 65)

Dentro de la estructura antigénica de los denguevirus resalta la proteína V3 o E, de envoltura o transmembranal, en ella reside una estructura antigénica compleja con los determinantes antigénicos del serotipo del complejo dengue y del grupo flavivirus (30)

### **2.2.4 AGENTE ETIOLOGICO**

Después de la fiebre amarilla, el dengue fue la segunda enfermedad cuya etiología fué asociada con un agente filtrable y ultramicroscópico, el cual era transmitido por un artrópodo. Los primeros investigadores sugirieron que era transmitida por mosquitos, lo cual se demostró hasta 1906, en ese año Bancroft publicó la primer prueba de que el mosquito *Aedes aegypti* era el vector de la enfermedad confirmándolo Cleland y Col. en 1919. (4, 14,5)

Durante la 2a. Guerra Mundial se hicieron notables estudios que demostraron el tamaño tan pequeño del agente etiológico y otras propiedades de este incluyendo la existencia de diferentes serotipos, adaptación del virus al ratón y la subsecuente mutación al punto de tratar de descubrir una vacuna. En 1944-1945, Sabin y col. aislaron por primera vez el virus en "voluntarios" inoculados con suero de pacientes, esto permitió disponer de cantidades adecuadas de cepas de denguevirus para realizar trabajos de laboratorio, investigación y de estudios epidemiológicos. Usando suero infectante y la transmisión por mosquitos se pudieron determinar los síntomas y signos clínicos después de la infección experimental, el tamaño de la partícula viral, la sensibilidad de los virus a los agentes desnaturalizantes, la susceptibilidad de animales a la infección, la inducción y duración de la inmunidad protectora después de la infección y la interferencia por virus heterólogos. (4, 59, 60)

La gran etapa en la virología del dengue comienza con el desarrollo del modelo de infección en el ratón lactante, Kimura y Holta fueron los primeros en reportar la adaptación de las cepas de denguevirus en el ratón albino suizo. Sabin y Schlesinger adaptaron la cepa *Hawaii* en ratones de dos semanas de edad y demostraron que las cepas adaptadas mantenían las mismas características serológicas de las cepas silvestres del virus. Ambos investigadores encontraron que

algunos virus adaptados al ratón, estaban atenuados en cuanto a su capacidad para enfermar a humanos . Meiklejohn y Col. fueron los primeros en sugerir el uso de ratones recién nacidos para el cultivo de los denguevirus (41, 46).

La adaptación y propagación de ambos tipos de virus (el silvestre y el atenuado), a títulos muy altos en ratón lactante dió como resultado el desarrollo de antígeno para la hemaglutinación y de fijación de complemento, lo que aportó grandes progresos en el diagnóstico, en la epidemiología y en la prevención del dengue. (52)

## 2.3 PATOGENESIS

### 2.3.1. ENFERMEDAD

El dengue es una enfermedad infecciosa epidémica, que es ocasionada por un virus del mismo nombre y el cual comprende 4 serotipos los cuales han sido denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4 descritos en la actualidad. Este virus es transmitido al hombre por la picadura de un mosquito del género *Aedes spp*. El dengue ha sido conocido también con otros nombres o sinónimos: Fiebre Quebrantahuesos, Denguero, Fiebre Polka, Fiebre del 5° día, Fiebre del 7° día, etc. (25,72).

La enfermedad presenta diferentes tipos o formas, la forma primaria ó benigna del dengue conocida como "Fiebre clásica del dengue o dengue clásico"; en la cual se ha observado que en niños menores de un año generalmente presentan una enfermedad indiferenciada o una erupción maculopapular. Los niños más grandes y los adultos usualmente presentan una enfermedad caracterizada por fiebre, cefalea, mialgias, síntomas gastrointestinales, y frecuentemente erupción maculopapular (24).

En contraste a la forma clásica del dengue, existen las llamadas formas secundarias ó severas de la enfermedad, la fiebre hemorrágica del dengue (FHD), que se caracteriza por anomalía en la hemostasis y aumento en la permeabilidad vascular, y de esta se desprende la segunda forma severa que conduce a un choque hipovolémico, esta forma se conoce como dengue con síndrome de shock (DSS). El dengue puede iniciarse como una epidemia urbana explosiva en las estaciones lluviosas y afectar a un gran número de individuos, dentro de los cuales se encuentran a turistas y viajeros que visitan áreas endémicas. El patrón de

transmisión de la enfermedad es irregular, aunque se ha observado una tendencia a incrementarse bianualmente ( 11, 21, 22 ).

En los últimos 20 años el dengue se ha convertido a nivel mundial en una de las enfermedades más importantes del hombre, en virtud del número de individuos que llega a afectar una vez que se ha introducido en una región dada (21).

#### FACTORES DE RIESGO.

Existen una serie de factores secundarios que determinan que las epidemias continúen ocurriendo a intervalos periódicos bianuales, abarcando extensiones cada vez mayores, con un movimiento continuo de los diferentes serotipos reconocidos. Diferentes estudios realizados sugieren que algunas características del hospedero, del virus y factores epidemiológicos influyen en la severidad de la enfermedad y sobre todo para que se manifiesten las formas severas, tales factores son: I ) Factores del hospedero, II ) Factores virológicos, y III Factores epidemiológicos ( 24 ).

Dentro de los factores del hospedero destaca: a) La edad, que es un factor importante en la presentación de la enfermedad, se ha observado que en la mayoría de los casos de FHD/DSS ha sido una enfermedad de niños, estudios realizados muestran que el 90% de los casos de FHD/DSS ocurre en los niños mayores de 1 año. Una prueba nos la da el brote ocurrido en Cuba que demostró que la distribución de casos de FHD/DSS indicó que la mayoría ocurrió en las edades de 3 a 11 años, detectandose que niños menores de un año mostraron una respuesta inmunológica de tipo primario y niños mayores mostraron respuesta de tipo secundario. b) El sexo es otro factor, se ha observado que las mujeres tienen una mayor tendencia a padecer la enfermedad. c) La presencia de anticuerpos pre-existentes en un individuo es otro factor, un estudio realizado en Bangkok, Tailandia mostró que madres que presentaban títulos de anticuerpos neutralizantes

de DEN-2 correlacionaba con la fecha de tróico de la FHD en el niño, se observó que el 90% de los casos de FHD/DSS ocurrió en los niños mayores de un año y el 99% de ellos tienen evidencia de una infección previa, se observó también que los niños menores de un año con FHD/DSS con infecciones son hijos de madres ya inmunes.

• Algunos datos epidemiológicos sugieren que la severidad de la enfermedad también está relacionada con la raza, se observó que la mayor incidencia de FHD/DSS en personas blancas que en aquellas de raza negra, observada durante la epidemia de dengue hemorrágico en Cuba, sugiere la posible participación de factores genéticos; sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna asociación de esta enfermedad con antígenos HLA. (9, 23, 24, 66)

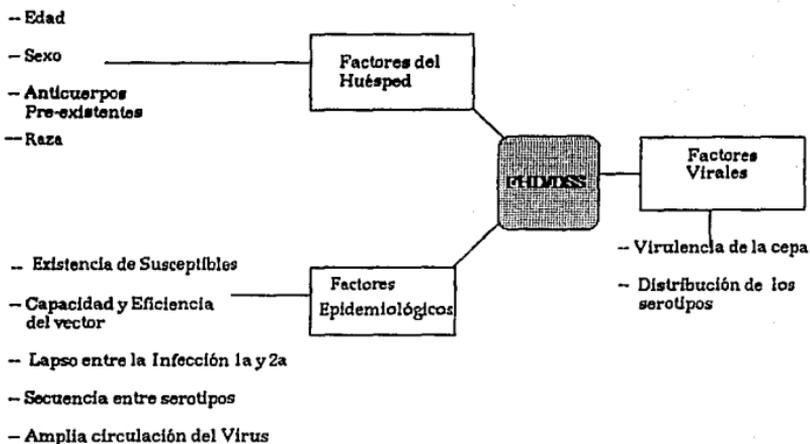
Los factores virales que constituyen un riesgo para manifestar las formas graves del dengue son: a) la variación en la virulencia de las cepas víricas que determinan la gravedad de la infección. b) la distribución geográfica endémica de diferentes serotipos del dengue. (24, 51).

Los factores epidemiológicos que son importantes para que se presente la enfermedad, y se manifiesten las formas severas de esta son: a) el lapso de tiempo entre la infección primaria y la infección secundaria, el cual no debe de ser mayor de 3 años, se ha visto que cuando el lapso rebasa este límite las posibilidades de que se presenten las formas severas disminuyen grandemente según otros estudios y observaciones hechas en la epidemia de Cuba. b) Otro factor es la secuencia entre los serotipos infectantes investigaciones realizadas muestran que esta debe de presentar al serotipo DEN-2 como causante de la infección secundaria, sea cual haya sido el serotipo infectante en la infección primaria (DEN-1, DEN-3 o DEN-4). c) El problema de la eficiencia y la capacidad vectorial, en una infección transmitida por artrópodos es otro factor epidemiológico importante, la eficiencia del vector es el de enfrentarse con poblaciones de mosquitos y virus genéticamente cambiantes y la capacidad vectorial, es la relación del

mosquito y el hombre para la transmisión de la enfermedad, esto es preferencia por el huésped humano, hábitos de picadura, susceptibilidad del vector y del huésped, densidad vectorial y longevidad del mosquito. (23, 24, 25)

La experiencia vivida en Cuba confirmó que el dengue tipo 1 (DEN-1) de 1977 y el dengue tipo 2 (DEN-2) de 1981 fueron responsables de un elevado número de enfermos que durante la epidemia de 1981 se concentró en un período de aproximadamente 4 años lo que habla de una gran circulación del virus, también lo que demostró que la población tenía poca protección contra el virus lo que indicó que la existencia de hospederos susceptibles a la enfermedad es otro factor epidemiológico importante.

Resumiendo cada uno de los factores de riesgo **Fig. 2**, se ha presentado la hipótesis integral sobre el desarrollo de FHD/DSS, que considera los factores de riesgo del huésped, epidemiológicos, así como los virales. Varios países de América, incluyendo México están expuestos a un alto riesgo debido a que reúnen cada uno de los factores antes mencionados y por lo tanto a sufrir la actividad de los denguevirus y de poder presentar las formas severas de esta enfermedad. La forma severa del dengue no tiene definido muy claramente su patogénesis; los principales factores son el aumento en la permeabilidad vascular y la hemorragia, que es consecuencia de la trombocitopenia que conduce a defectos de la coagulación activación de la vía intrínseca de la coagulación, y esto aunado a los factores de riesgo que conducen a la presentación de estas formas de la enfermedad, son de trascendencia para que el dengue sea considerada como una de las enfermedades con mayor relevancia en salud pública. (9, 42)



**FIGURA No. 2. FACTORES DE RIESGO PARA CONTRAER  
DHD/DSS**

Fuente : RAMOS CELSO. BIOLOGÍA DE LA INFECCION CAUSADA POR EL VIRUS DEL DENGUE  
SALUD PUBLICA MEX. 1989. 31 : 54-72

C.H.F.

### 2.3.2. MECANISMO DE TRANSMISION. (VECTORES)

Los denguevirus tienen bien definido su mecanismo de transmisión, estos virus son transmitidos al hombre mediante la picadura de un mosquito, el cual actúa como vector. Este mosquito pertenece al género *Aedes* siendo la especie *Aedes aegypti* el más común de los vectores. El mosquito pica durante el día y puede transmitir el virus inmediatamente o después de un período de 8-10 días, tiempo durante el cual se multiplica dentro de las glándulas salivales volviéndose infectante capaz de transmitir la infección, este período se denomina: período de incubación extrínseco (PIE). Una vez infectado, el mosquito será capaz de transmitir la infección funcionando como vector el resto de su vida. (7, 76).

Por otro lado el virus puede ser transmitido transováricamente por ciertas especies de mosquitos *Aedes*, este fenómeno puede permitir el mantenimiento natural del virus y esto explica porque el virus se mantiene activo durante períodos largos interepidémicos. La transmisión epidémica de este virus es más alta en áreas donde abunda *A. aegypti*. Recientemente, *A. albopictus* ha sido introducido al continente americano y se ha detectado ya en 15 estados de Estados Unidos (12, 8).

En condiciones favorables, el ciclo de vida de este mosquito se puede completar en diez días, el hábitat de las larvas son los depósitos de agua tales como: recipientes de metal, barriles, cisternas, hoyos en los árboles y rocas, llantas de automóviles, etcétera. Los mosquitos pican en silencio y preferentemente en los tobillos, codos, parte posterior de las rodillas y del cuello. *A. aegypti* es un mosquito doméstico, altamente antropofílico, prefiere depositar sus huevecillos en recipientes de color obscuro y diámetro ancho, especialmente en aquellos que se localizan en áreas sombreadas. El ciclo básico se desarrolla en el hombre y en el mosquito, la fuente de infección para el mosquito es el hombre en el período virémico que puede durar de 5 a 6 días. La ocurrencia de casos humanos

libres de *A. aegypti* además donde se encuentra *A. albopictus* indicaría que el hombre podría ser un huésped accidental de ese ciclo, en el marco epidemiológico total, la existencia de un ciclo selvático entre monos y mosquitos tendría una importancia significativa desde el punto de vista de salud pública. (27,1)

### 2.3.3. PERIODO DE INCUBACION Y CUADRO CLINICO

El espectro clínico de esta enfermedad varía desde un cuadro febril (dengue clásico o infección primaria) hasta las formas severas que pueden manifestarse como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) o como dengue con síndrome de choque (DSS). El dengue clásico o infección primaria se caracteriza por tener un periodo de incubación de 3 a 14 días. El cuadro clínico se presenta bruscamente como fiebre bifásica intermitente, escalofríos, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retro-orbital, exantema máculo-papular en el tronco y extremidades, náusea y/o vómito es transitorio y puede verse en las primeras 24 - 48 horas del inicio de la fiebre, la fiebre persiste de 4-6 días terminando en crisis, con sudoración intensa, la viremia generalmente coincide con la fiebre. La exploración física del paciente puede mostrar hepatomegalia moderada, bradicardia y linfadenopatía. Los datos de laboratorio son normales, excepto por una leucopenia moderada. La viremia elevada puede durar de 3 a 4 días (52).

Las formas severas de la enfermedad (FHD/DSS) se inician con un cuadro de fiebre elevada que al remitir se asocia con agravamiento del estado general y letargo, con taquicardia, hipotensión y disminución en la perfusión tisular periférica, con manifestaciones hemorrágicas que incluyen por los menos una prueba de torniquete positiva y cualquiera de los siguientes signos: petéquias, púrpura, equimosis, epistaxis, hematemesis, gingivorragia o melena. En el 90 % de los casos se presenta hepatomegalia y los exámenes de laboratorio muestran un

Incremento en el hematocrito (hemoconcentración), leucocitosis moderada, hipoalbuminemia, hipovolemia, disminución del fibrinógeno, depresión de más del 50% de los niveles de  $C_3$  y del proactivador de  $C_3$  y menos de 100,000 plaquetas/  $mm^3$  (24). Las características, la evolución de los signos y síntomas son esquematizados en la **figura no.3**.

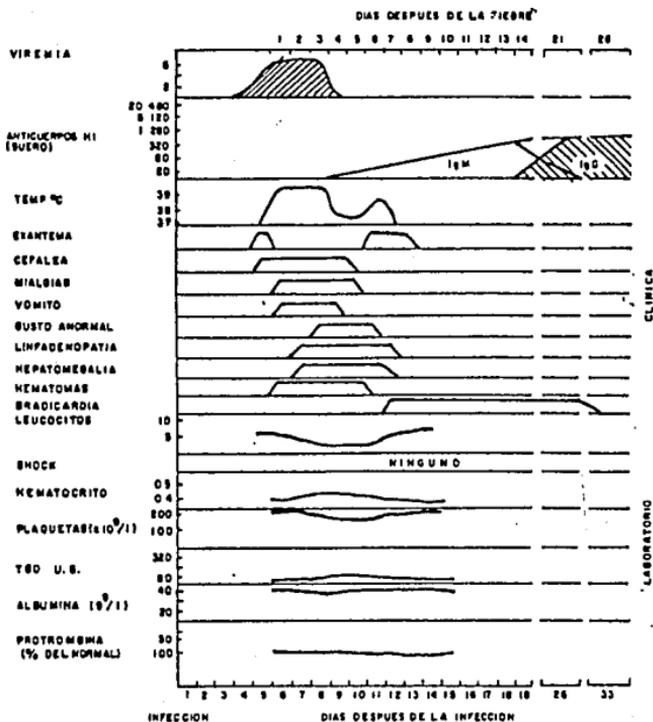
De acuerdo a lo anterior la organización mundial de la salud (OMS 1975), usando datos clínicos de Tailandia se ha formulado una clasificación de fiebre hemorrágica del dengue en cuatro grados clínicos de gravedad (24):

- GRADO I Fiebre, síntomas constitucionales y prueba del torniquete positiva.
- GRADO II Grado I más hemorragia espontánea en la piel, las encías, el tracto gastrointestinal y otros lugares.
- GRADO III Grado II más insuficiencia circulatoria y agitación.
- GRADO IV: Shock profundo; presión arterial no detectable.

En todas las etapas hay trombocitopenia y hemoconcentración. Los grados III y IV se llaman también *síndrome de shock por dengue*. La **figura no 4** resume las características clínicas de las formas graves del dengue. (24)

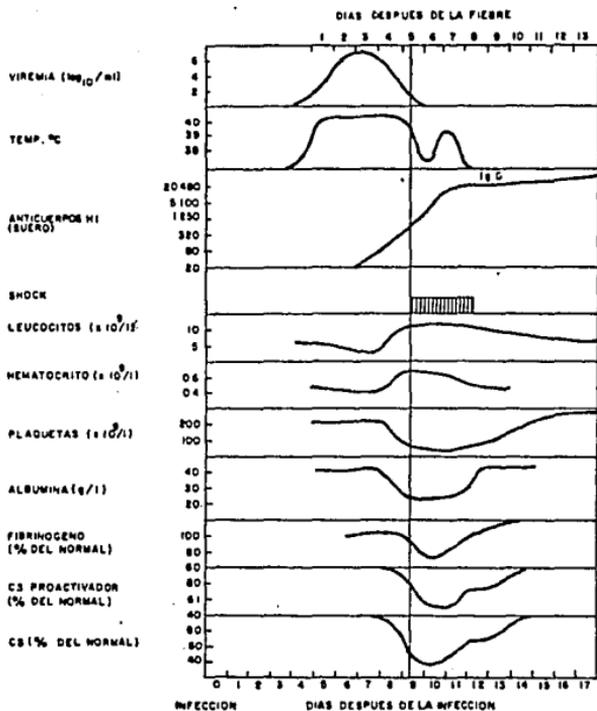
Otros hallazgos de laboratorio son, elevación de las transaminasas y nitrógeno de uréa en la sangre, el tiempo de protrombina se encuentra prolongado con disminución en los factores II, V, VI, IX y XII de la coagulación. La disminución del complemento y la hipofibrinogenemia correlacionan con el inicio del shock y con la severidad de la enfermedad. De estos hallazgos se puede definir a la FHD/DSS como un síndrome de aumento agudo de la permeabilidad vascular, acompañado por activación del sistema del complemento y de la coagulación (24).

Hay importantes diferencias clínicas entre la enfermedad observada en Asia y la observada en las Américas. En el Asia, los casos de FHD/DSS son compatibles



**FIGURA No.3 CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO DEL DENGUE CLASICO**

FUENTE: HALSTEAD S.B. (1980) Pathogenesis of dengue: Challenges of molecular biology  
*SCIENCE* 239: 476 - 481



**FIGURA No.4 CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO EN DENGUE CON SINDROME DE SHOCK**

FUENTE: HALSTEAD S.B (1980) Pathogenesis of dengue: Challenges of molecular biology  
*SCIENCE* 239: 476 - 481

con la definición de la OMS; la enfermedad hemorrágica caracterizada por un severo sangrado del tracto digestivo alto, también ha sido frecuente en la mayoría de las epidemias de América. Este tipo de FDH fue descrito en Tahití, y fue una causa significativa de muerte en Indonesia. En contraste con la clásica FDH/DSS, se caracterizó por un sangrado masivo del tracto gastrointestinal antes de que se iniciara el choque sin ninguna evidencia de hemoconcentración. La trombocitopenia y la coagulación intravascular diseminada (CID) son hallazgos frecuentes. Este tipo de enfermedad hemorrágica probablemente tiene una patogénesis diferente a la de la clásica FDH/DSS. Además con frecuencia es más difícil de manejar y está asociada con una mortalidad alta. Este tipo de enfermedad hemorrágica que es completamente diferente a la clásica FDH/DSS, es más común en América que en Asia. (43, 70)

Un ejemplo clásico lo es la epidemia de FDH/DSS clásica ocurrida en Cuba por DEN-2 en 1981, en esta se encontraron también muchos casos con sangrado gastrointestinal alto. Además de 13 casos mortales en niños de los que se dispone información clínica detallada, de los cuales 12 (92%) presentaron "sangrado de tubo digestivo alto", se presentaron evidencias de hemoconcentración sólo en seis pacientes (46%), lo que sugiere que estos niños habían tenido una enfermedad hemorrágica similar a la descrita en Indonesia. En la epidemia de 1984 por DEN-4, en Mérida Yucatán, México, nueve casos (cuatro mortales), de enfermedad hemorrágica, fueron confirmados serológicamente o por aislamiento. (23, 44, 70).

Se trató de cinco niños y cuatro adultos, un caso fatal (de 9 años) tuvo una historia clínica compatible con la clásica FDH/DSS, con evidencias de hemoconcentración, pero el curso clínico de los demás casos mortales, incluyendo al niño antes mencionado se vieron complicados por un severo sangrado del tracto gastrointestinal. (44)

En resumen, las infecciones severas o fatales por dengue parecen estar aumentando en muchos países de la región. En tanto que algunos de estos casos han llenado el criterio de definición de la OMS para la FHD/DSS, otros no. Estas diferencias refuerzan la necesidad de que los clínicos de las Américas definan el espectro clínico de la infección por dengue en cada país durante las epidemias causadas por los diferentes serotipos y cepas del virus. (28)

#### **2.3.4. MECANISMO DE PATOGENICIDAD.**

Los eventos inmunológicos que ocurren en la infección por los denguevirus, son fundamentales para entender y comprender la fisiopatología de esta enfermedad y de las formas graves de esta (FHD/ DSS). (25)

Primeramente uno de estos eventos es la existencia de 4 serotipos de denguevirus (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN- 4,) en la naturaleza relacionados serológicamente y que penetran a sus huéspedes humanos parenteralmente. Los individuos infectados con un serotipo mantienen una memoria inmunológica prolongada, para evitar ser infectados por serotipos homólogos, así mismo tienen un periodo corto de protección cruzada contra serotipos heterólogos, después de que pasa este pequeño lapso de tiempo son completamente susceptibles a la infección por otros serotipos (25).

La infección primaria y secundaria pueden ser distinguidas por respuestas serológicas características. Los anticuerpos formados en una infección primaria son en su mayor parte de la clase IgM y están dirigidos principalmente contra los determinantes antigénicos tipo específicos del virus del dengue; las infecciones secundarias inducen anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos del grupo flavivirus o complejo o subcomplejo de los denguevirus (25).

Después de la inoculación en la piel, por el mosquito *A. aegypti*, de un serotipo particular del virus del dengue el virus llega a sus sitios de replicación que son primordialmente células del tejido linfoide ( Monocitos, macrófagos, histiocitos y células de Kupffer) (24).

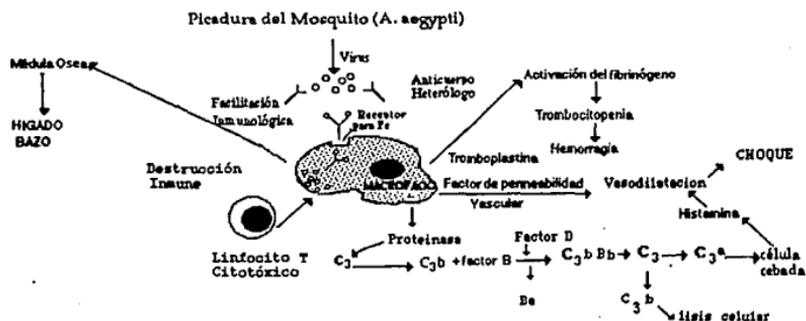
Durante esta infección el huésped genera una respuesta inmune que involucra la formación de anticuerpos (Clase IgM), los anticuerpos generados neutralizan los virus circulantes y los macrófagos infectados destruyen a los virus intracelulares. La infección primaria se resuelve en una semana y los pacientes quedan inmunes contra cualquier infección de los 4 serotipos durante un lapso de 3 a 6 semanas. Posteriormente la inmunidad residual es permanente solo para el serotipo específico (24, 25, 61).

Cuando ocurre una nueva infección en este caso con un virus homólogo (mismo serotipo) la memoria inmunológica del hospedero responde eliminando al virus y no se produce la enfermedad. En una infección que se da cuando un serotipo diferente al de la primera infección (virus heterólogo) y en especial el serotipo DEN-2, el cuadro clínico toma un curso diferente, desencadenando una serie de eventos que terminan con la manifestación de las formas severas (FHD/DSS) de la enfermedad. (51)

Estos eventos son explicados por la teoría propuesta por Halstead y sostiene que la presencia previa de anticuerpos (infección primaria) contra un serotipo y la siguiente reinfección con un serotipo diferente (infección secundaria) dentro de un tiempo determinado son condiciones para que se presenten las formas graves de la enfermedad. Halstead propuso que la patogénesis central del FHD/DSS radica principalmente en que los anticuerpos (IgG) preformados no neutralizantes y heterotípicos (Anticuerpos "Facilitadores" de la infección) forman un complejo Ac-virus que facilita la opsonización uniéndose firmemente a los receptores Fc de los monocitos y macrófagos, este concepto fue demostrado por Daughaday y Col. ellos

proponen que existen dos mecanismos por el cual el virus puede infectar cultivos de monocitos I) a través de un receptor viral sensible a tripsina o II) a través de un receptor Fc que no es sensible al tratamiento con tripsina, sus resultados sugieren que la entrada viral fue facilitada por fagocitosis de complejos inmunes vía receptores Fc. Además de que estos complejos inmunes facilitan la infección de monocitos y macrófagos, permiten una amplificación progresiva de la replicación viral en estas células. La evidencia *in vivo* que sugiere la participación de los anticuerpos "facilitadores" en la enfermedad, es en estudios realizados en monos en los cuales se observó que la viremia y la presencia del virus en los tejidos fueron más altas en los animales que tenían anticuerpos preformados. Los monocitos infectados se vuelven de esta manera los blancos de los mecanismos inmunes, esta respuesta es probablemente mediada por células T o células T citotóxicas, estos monocitos al ser atacados liberan una serie de factores (factor de permeabilidad vascular, enzimas activadoras del complemento, y tromboplastina) los cuales tienen sus efectos sobre la permeabilidad vascular, consumo de fibrinógeno y activación del sistema del complemento, esta cascada de eventos fisiopatológicos incluyen pérdida de plasma, hipotensión y anomalías en la coagulación **figura no. 5 (16, 24, 26, 28, 25, 30)**.

Observaciones hechas en el laboratorio y estudios realizados han mostrado que la cantidad de denguevirus, la cantidad de complejos inmunes, el consumo de complemento por la vía clásica y las disminuciones en la circulación de C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> están en relación directa con la severidad de la enfermedad. (24)



**FIGURA No. 5 REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL FENOMENO DE FACILITACION POR ANTICUERPOS Y DE LOS MECANISMOS EFECTORES Y AMPLIFICACION QUE PARTICIPAN EN LA PATOGENESIS DE LA FHD/DSS**

C.H.F.

FUENTE: Halstead SB. Immunopathology in viral disease: immune enhancement of dengue virus infection virology 1982. 34: 41-85

## **2.4.- DIAGNOSTICO.**

### **2.4.1 DIAGNOSTICO CLINICO DIFERENCIAL.**

El criterio clínico que toman los médicos en los centros de salud durante los brotes de dengue es muy riguroso, consiste en la selección de aquellos pacientes que presenten la siguiente sintomatología: fiebre de por lo menos 38.5° C de 1 a 5 días de duración y uno o más síntomas o señales "no específicos" tales como dolor detras de los ojos, mialgia, dolor de las coyunturas, vómito y erupción (76).

Durante los periodos interepidémicos la enfermedad de dengue aparece usualmente en una forma leve y muchas veces encubierta por otras infecciones virales, por lo tanto los médicos pueden ver con poca frecuencia, pacientes con síntomas de dengue clásico. Por lo tanto para obtener muestras de pacientes puede ser necesario que el criterio clínico para la selección de pacientes será simplemente: fiebre de por lo menos 38.5 °C de 1 a 5 días de duración y la evaluación del médico de un síndrome viral incluyendo a pacientes con síntomas de las vías respiratorias si fuese necesario. Estudios clínicos anteriores han mostrado que los pacientes con dengue pueden quejarse de males respiratorios tales como tos, garganta inflamada y rinitis. Así mismo cualquier paciente con síntomas hemorrágicos o encefalíticos en quienes se sospeche una enfermedad viral. La información que acompañe la muestra tomada del paciente deberá ser tan detallada como sea posible y deberá incluir temperatura, presión arterial y pulso, cuando realmente se cree que el paciente tiene dengue entonces se deberá incluir hematocrito, prueba de torniquete y cuenta de plaquetas. Se considera que esta información es la más importante para los pacientes con dengue especialmente aquellos que están muy enfermos. (76)

## 2.4.2 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La confiabilidad de los resultados de las pruebas de laboratorio dependen en gran parte del cuidado y juicio con que se tomen, se manipulen y se remitan las muestras para su diagnóstico. Con las debidas precauciones de asepsia, se tomarán 10 ml de sangre total. Los recipientes en que se recoja, y a los que se transfiera, no deben tener sustancias químicas, aditivos ni preservativos. Todas las muestras, debidamente rotuladas y especificadas, se enviarán y almacenarán en condiciones adecuadas de refrigeración para los futuros estudios de dengue. (52)

### 2.4.2. a METODOS DE AISLAMIENTO

Los especímenes para aislamiento de virus deben tomarse durante los 5 primeros días de la enfermedad. Los tubos de sangre se ponen en refrigeración lo más pronto posible después de obtenerla. Para lograr óptimas condiciones de aislamiento, el suero debe ser separado del coágulo al siguiente día de la toma, el suero se guarda en recipientes estériles llenados a 2/3 de su capacidad y se congelan entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  (52).

El virus del dengue es capaz de replicarse en cultivos de células de mamíferos y de mosquitos. Actualmente existen varias líneas celulares derivadas de mosquitos, las cuales tienen una mayor sensibilidad para replicar al virus y se emplean como técnicas de diagnóstico para aislar e identificar a los diferentes serotipos, el efecto citopático va desde severo hasta inaparente, dependiendo de la línea celular y de la cepa de virus usada, las células se hacen refractiles, redondeadas y se fusionan. (6, 75).

Las células de mamíferos que más se han utilizado para propagar a los denguevirus incluyen (60):

- a) **LLC-MK** Obtenida de riñón de mono verde
- b) **VERO** " " " "
- c) **BHK-21** Obtenida de riñón de hamster lactante
- d) **FRhL** Obtenida de pulmón fetal de mono rhesus

Las líneas celulares de mosquitoson altamente susceptibles a la infección por denguevirus (52):

- a) **C6/36** Obtenida del mosquito *Aedes albopictus*
- b) **LSTM-AP61** Obtenida del mosquito *A. pseudoscutellaris*
- c) **TRA-171** y **TRA-284SFG**, obtenidas del mosquito *Toxorhynchites amboinensis*

El método mas sensible de aislamiento reportado es la inoculación intratorácica de mosquitos de las especies *T. amboinensis* o *A. aegypti* con este método los mosquitos son inoculados con material conteniendo virus e incubados por 14 días a 30°C. Los antígenos de dengue son detectados en mosquitos infectados mediante anticuerpos de referencia en pruebas de fijación de complemento o inmunofluorescencia (34)

## 2.4.2. b METODOS SEROLOGICOS.

El diagnóstico serológico en los denguevirus es complicado por la existencia de reactividad cruzada con los determinantes antigénicos que comparten los 4 serotipos de los denguevirus y miembros de la familia *Flaviviridae*, aún después de una exposición sencilla, el suero de un paciente en estado convalescente usualmente contiene anticuerpos con reactividad cruzada detectable. Existen varias técnicas que permiten la determinación de anticuerpos antidengue, en gran parte el diagnóstico serológico continúa realizándose con pruebas tradicionales como son: La Fijación de Complemento (FC), Neutralización por reducción de placa (PNRP), Inhibición de la hemaglutinación (IH), y más recientemente la técnica de ELISA y otras que se discuten más adelante. (45)

La prueba de PNRP es la establecida, aceptada, estandarizada y se basa en un sistema un tanto insensible de ensayo en placa con células de mamífero bajo una capa de agar es una técnica muy específica y se ha empleado como prueba confirmatoria (37).

La prueba de FC es de gran utilidad cuando se trata de identificar anticuerpos producidos en infección reciente, no sirve como prueba confirmatoria por las reacciones cruzadas entre los miembros de la familia *Flaviviridae* (34).

### **Inhibición de la Hemaglutinación.**

Desde la aparición de las infecciones, en México en el año de 1978 por denguevirus el diagnóstico serológico casi se ha limitado a una técnica serológica que por su sencillez, especificidad y sensibilidad ha sido utilizada como técnica de mayor empleo en el diagnóstico del dengue. Esta técnica es la Inhibición de la

hemaglutinación (IH) desarrollada por Clarke y Casals en 1958 , aprovechando la capacidad de algunos virus de aglutinar glóbulos rojos de varias especies animales (hemaglutinación viral), estos al reaccionar con sus anticuerpos homólogos, se bloquea la capacidad hemaglutinante viral, este es el principio de la técnica de IH. Los anticuerpos IH aparecen en el curso de la primera semana de la aparición de los síntomas; alcanzan sus títulos máximos en las siguientes 4 a 8 semanas y bajan paulatinamente a lo largo de los años, persistiendo a niveles detectables hasta por 50 años (24), en el caso de los denguevirus estos tienen solo la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de ganso, además de que esta hemaglutinación es dependiente del pH siendo el rango de 6.0 a 7.0 . Esta técnica tiene la desventaja de que puede presentar reacción cruzada con miembros de la familia de los denguevirus, además de que solo tienen valor diagnóstico cuando se analizan muestras pareadas de suero, una muestra tomada en fase aguda y una segunda muestra tomada en fase convalescente 12 a 16 días después de la 1a. muestra . Los sueros antes de usarlos se deben adsorber con kaolín y eritrocitos de ganso para eliminar hemaglutininas inespecíficas. La técnica de IH es ideal para conducir programas de investigación epidemiológica encaminados a determinar la circulación de arbovirus en una región (13, 24, 76).

En años recientes el mayor avance alcanzado en el diagnóstico serológico del dengue es el desarrollo de la técnica de ELISA en sus dos modalidades de captura de IgM y de IgG, el uso general de esta técnica proporciona nueva información para la comprensión de la dinámica de la respuesta inmune, la que una vez conocida origina la necesidad de una modificación en la estrategia de vigilancia del dengue (10).

## **IgM-ELISA**

La técnica de ELISA para captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) desarrollada por varios investigadores en el Center for Disease Control de San Juan Puerto Rico C.D.C. posee ciertas características que la hacen ser en el futuro la técnica de elección para el diagnóstico del dengue, una de las características más útiles de este método es el de proveer un diagnóstico rápido con una sola muestra colectada en fase aguda. Estudios realizados por Innis y col, revelaron que entre 6 y 10 días después de haberse iniciado la enfermedad, más del 90 % de los especímenes tomados en fase aguda fueron positivos. Con especímenes colectados en fase convalescente la positividad de IgM se ha reportado en el 98 % de los casos (37).

La técnica de ELISA-IgM es muy útil para realizar investigaciones postepidémica, sin embargo se sabe que la IgM anti-dengue desaparece alrededor de los 2 meses en muchos pacientes después de la infección, por lo tanto los especímenes de convalescentes deberán ser colectados antes de que la IgM llegue a niveles no detectables.(15)

La determinación de IgM es extremadamente útil como indicador para diagnóstico temprano del dengue. La prueba de ELISA-IgM ha sido utilizada por varios investigadores para distinguir entre los títulos de IgM donde co-circulan los virus de la encefalitis japonesa y dengue, en esas áreas donde circulan dichos virus estos autores reportaron una reacción cruzada después de la infección por dengue de tal manera que se debe tener cuidado al interpretar los resultado de IgM-ELISA para dengue en donde se sepa que haya circulación de virus miembros de la familia *Flaviviridae*. (37)

## 2.4.2. c OTROS METODOS DIAGNOSTICOS.

Una serie de métodos complementarios para el diagnóstico de infecciones por dengue han sido desarrollados, en estos métodos se pone de manifiesto el amplio avance en el campo de la investigación virológica ya que los métodos que aquí se mencionan han sido desarrollados y se emplean principalmente para la investigación virológica mas que en sí que para el diagnóstico.

El reciente desarrollo de las técnicas de PCR (*Reacción En Cadena de la Polimerasa*), es claramente uno de los principales avances técnicos en el diagnóstico de las enfermedades virales. la habilidad para amplificar millones de veces una mínima cantidad de ácido nucléico provee a la técnica de un poder extraordinario. Actualmente el PCR ha sido extensamente evaluado en varios laboratorios para el diagnóstico del dengue. Puesto que la secuencia de bases de los 4 serotipos es conocida pronto se podrá disponer de los *primers* tipo-específicos. Actualmente ya ha sido desarrollada una técnica que combina PCR y la identificación de virus por hibridación usando sondas no radiomarcadas (71).

Los antígenos de dengue han sido detectados mediante la inoculación de células de mosquito con anticuerpos de referencia en ensayos de Inmunofluorescencia (IF), la técnica ha sido introducida en muchos países y ha contribuido grandemente a mejorar la vigilancia global del dengue. (36)

Para la detección del virus de la fiebre amarilla se desarrolló la técnica de Radiomunoensayo en fase sólida (RIA) que actualmente se emplea en la investigación y detección de los denguevirus. La prueba emplea un anticuerpo

monoclonal reactivo al grupo flavivirus pegado a una perla de poliestireno como soporte y una sonda radiomarcada tipo-específico en un RIA simultáneo tipo sandwich, la sensibilidad del ensayo para virus propagados en cultivo celular fue de  $2 \log_{10}$  dosis infectante de mosquito/ 100  $\mu\text{l}$  y la reactividad cruzada con flavivirus fue buena. El uso de sondas radiomarcadas limita grandemente la aplicación de esta técnica en la mayoría de los laboratorios (77)

Estos son algunos de los métodos empleados en la actualidad para la investigación y diagnóstico de infecciones por dengue ; sin embargo se están implementado nuevas técnicas que permitan en el futuro un diagnóstico rápido, y confiable .

## 2.5.- EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL.

### 2.5.1 SITUACION PRESENTE EN MEXICO

Los primeros casos de dengue diagnosticados y reportados en México aparecieron a finales de 1978 en la frontera sur con Guatemala, en Tapachula Chiapas. La primera impresión diagnóstica que se tuvo en los 38 casos fue rubéola. Con el diagnóstico de dengue se lanzó una campaña de alerta en la región sur del país y para 1979 el número de casos sospechosos de dengue aumentó a 6,187. Rápidamente se diseminó a 9 estados Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo fueron los más afectados, Ya que en 15 estados reportaron transmisión de dengue a largo del año. Un total de 51,406 casos se reportó en la costa del Golfo y la frontera noreste (39)

En 1981, la incidencia fue de 17,046 casos y la transmisión se detectó en los estados de la costa del Pacífico, siendo identificado el padecimiento hasta el estado de Sinaloa. En 1982 la enfermedad se reconoció en 19 estados y se reportaron 32,640 casos en la costa del Golfo y el Pacífico hasta Baja California Sur. En 1983 nuevas regiones en el norte y prácticamente toda la costa del Pacífico detectaron la transmisión de la infección con 19,028 casos reportados. Hacia el interior del territorio el dengue sólo se había identificado en zonas aisladas, pero durante este año la transmisión se extendió ampliamente en las áreas del interior. Durante los años de 1984 y 1985 el dengue se identificó en 25 estados con 27,645 y 13,688 casos respectivamente (55). En 1985 se realizó una encuesta serológica en Yucatán, donde se encontró seroprevalencia de anticuerpos de 72.5 % que indicó lo diseminado e intenso de la transmisión de la infección en dicha entidad (44).

Durante 1986 se realizó una encuesta seroepidemiológica en 86 localidades del país y en la población menor de 25 años. Los resultados serológicos muestran un

amplio espectro de prevalencias de anticuerpos a los virus del dengue con un rango de 0% hasta un 88% en ciertas localidades. Dicho estudio demostró lo amplio de la distribución de la infección en el país y la intensidad en cuanto a la transmisión en ciertas regiones del país (20).

La incidencia de dengue a lo largo de la década de los 80's ha ido en descenso con discretos aumentos bianuales. La distribución de la enfermedad en la población tiene un predominio en el grupo de adultos jóvenes, aquí debe tomarse en cuenta que el padecimiento en la población pediátrica es fácilmente confundible con otras enfermedades propias de la infancia. Este patrón también responde al efecto de que los adultos han estado más años expuestos al riesgo y la probabilidad de enfermarse es mayor que en la población infantil (21).

De los 227,229 casos de dengue reportados de 1979 hasta enero de 1990, el 86% de los casos fueron reportados por 13 entidades federativas: Veracruz (29,715), Guerrero (23,816), Oaxaca (17,568), Chiapas (16,468), Yucatán (15,558), Tamaulipas (14,927), Coahuila (14,697), Nuevo León (12,720), Jalisco (11,472), Sinaloa (11,402), Nayarit, (10,555), Puebla (8, 881), y Michoacán (8,807). (22)

El dengue es una enfermedad epidémica con ciertas determinantes climatológicas, la biología del vector se encuentra muy asociada a la temperatura y la precipitación pluvial, de ahí que existe en México un patrón de estacionalidad bien delimitado con los picos de transmisión de dengue durante los meses de agosto y septiembre.(23)

La definición del panorama serológico de dengue en nuestro país es muy pobre. La vigilancia serológica tiene diversas limitantes, la infraestructura de laboratorios para el diagnóstico de dengue se limita al Nacional de Referencia en el INDRE.

Se han detectado solo tres serotipos en el territorio, solo dos de ellos han sido responsables de varias epidemias y brotes. Hasta ahora sólo Chiapas, Yucatán, Tabasco, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Jalisco, Nayarit y Sinaloa tienen aislamientos de dos o más serotipos y sólo en estos estados se reconoce el riesgo de dengue hemorrágico. El tener una vigilancia serológica intensiva permitirá lograr conocer la distribución geográfica de serotipos e identificar la proporción de infecciones secundarias para poder definir las áreas de mayor riesgo. (22)

#### PREVENCIÓN.

La prevención de brotes en estas áreas endémicas está basado en el control a largo plazo por medidas antimosquito. Actualmente se llevan a cabo investigaciones para el desarrollo de una vacuna tetravalente en contra de los 4 serotipos de dengue, la inmunización contra el virus del dengue sin una completa protección contra los 4 serotipos podría sensibilizar a los individuos a padecer FHDNDSS. La selección de mutantes virales por pases sucesivos en cultivo de células permite la selección de vacunas atenuadas (23).

Uno de los problemas para la generación de vacunas contra el virus del dengue es la generación de anticuerpos contra el virus que pueden facilitar la replicación del mismo, a pesar de que varios grupos de investigación están trabajando en la generación de vacunas atenuadas contra los 4 serotipos de este virus, los candidatos a vacuna que han sido ensayados hasta la fecha en humanos se asocian en mayor o menor grado con síntomas clínicos adversos y/o una incompleta respuesta inmune protectora. Actualmente se está analizando la posibilidad de utilizar como vacunas a las proteínas no estructurales. Así por ejemplo se tiene que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales contra la proteína no estructural NS-1 del virus de DEN-2 o la inmunización activa con esta proteína en ratones y monos ha resultado en una resistencia al reto con el virus completo. (23, 24)

A pesar de los esfuerzos que se están haciendo en la generación de vacunas atenuadas de dengue, es claro que a la fecha no existen vacunas inocuas, suficientemente efectivas y capaces de inducir protección, se buscan alternativas que permitan resolver el problema como es los estudios de clonación del genoma del virus. (8)

## 2.5.2 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

La mayor circulación del virus del dengue Fig. 6 corresponde al serotipo DEN-1; el DEN-2 ha estado limitado a algunas localidades de 5 estados de la república y el serotipo DEN-4, de circulación más amplia que el serotipo DEN-2 se reportó hasta 1990 ya en varios estados de la república mexicana principalmente en los estados del centro y sur del país.

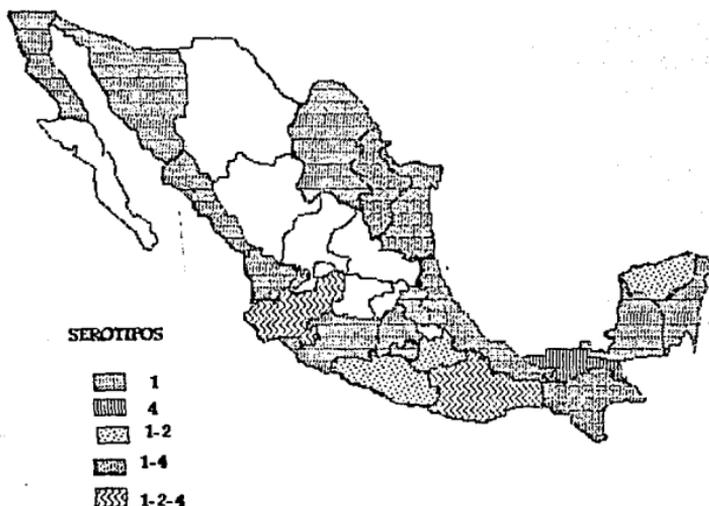
## 2.5.3. MEDIDAS DE CONTROL.

Para el control de brotes se tienen que llevar a cabo principalmente dos actividades en forma simultanea: a) control del mosquito y b) tratamiento de pacientes en hospitales (9).

Las medidas de control no se limitan al vector y tratamiento de pacientes un programa básico de control incluye la vigilancia de FHD mediante las siguientes actividades(9) :

### I- VIGILANCIA DE LA FIEBRE

Con el fin de determinar la presencia de una epidemia de una enfermedad febril, el "programa de vigilancia de fiebre" deberá mantenerse como un programa que debe incluir: A) la vigilancia de casos de fiebre, o B) un estudio etiológico de fiebre de origen desconocido. (9)



**FIGURA No.6 DISTRIBUCION DE SEROTIPOS DE DENGUE.  
MEXICO, 1978 - 1990**

## II- VIGILANCIA DEL VECTOR

A lo largo del país deberá establecerse la presencia, la densidad, y la prevalencia estacional del vector *Aedes aegypti* y su susceptibilidad a los insecticidas.(●)

## III- VIGILANCIA VIROLOGICA

El monitoreo de la infección del virus de dengue y la ocurrencia de los serotipos en áreas endémicas deberá ser instituido tan pronto como sea posible. A la fecha de inicio la virológica consista en obtener reportes de aislamiento de virus de pacientes y de mosquitos en el laboratorio de arbovirus.(●)

## IV- VIGILANCIA SEROLOGICA

La vigilancia serológica puede ser usada para detectar infecciones asintomáticas así como la presencia de diferentes serotipos de dengue, son comunidades en riesgo de brotes de FHD si otros serotipos de dengue fueran introducidos.(●)

## **2.6. TRATAMIENTO**

En la primoinfección no existe la necesidad de un tratamiento específico, la enfermedad es autolimitada. En los adultos la convalecencia es prolongada, hay estado depresivo o postración que no ameritan más que reposo y manejo sintomático. La aspirina está contraindicada por la posibilidad de agravar la tendencia a las manifestaciones hemorrágicas. (72)

El fundamento terapéutico principal en los casos de FHD/DSS, es la rápida reposición de líquidos intravasculares mediante la aplicación intravenosa. Los siguientes puntos hacen posible estimar que suplementos se requieran. (72)

En las peores situaciones documentadas (Cuba 1981) la prevalencia de pacientes gravemente enfermos que requieran de hospitalización, fue de 1 caso por 100 personas, los casos hospitalizados usualmente requieren terapia intravenosa con **solución salina**, alrededor del 20 % de todos los casos hospitalizados requerirán expansores de volumen intravascular como son el **Dextrán 40, albúmina, o plasma**. Alrededor del 10 % de todos los casos hospitalizados requieran **sangre**, y detención de la coagulopatía de consumo mediante la administración de **heparina** y mejoramiento de la hematosis (**Oxígeno**). (72)

Basándose en estos datos los requerimientos para poblaciones de 10,000 habitantes (100 casos de FHD) se necesitan de 200 a 300 litros de solución salina, para 20 casos de FHD con hipovolemia se necesitan 20 litros de expansores del volumen. Para 10 casos de FHD con hemorragia serán necesarios por lo menos 10 unidades de sangre. La oportunidad de un tratamiento exitoso del dengue hemorrágico, es el de alertar tempranamente su emergencia. La exploración física, el curso clínico bifásico y la hemoconcentración son útiles para establecer un diagnóstico precoz e iniciar un tratamiento correctivo del estado de choque y de la coagulopatía. (72)

### **3. O B J E T I V O S**

## **OBJETIVOS:**

- 1.-** Realizar las técnicas de MAC-ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación en un laboratorio de arbovirus en México para el diagnóstico de infecciones causadas por denguevirus.
- 2.-** Comparar las técnicas de MAC-ELISA y de Inhibición de la Hemaglutinación para establecer las ventajas de MAC-ELISA sobre I.H. en el diagnóstico de infecciones por dengue.
- 3.-** Determinar la importancia de la detección de anticuerpos IgM en infecciones causadas por denguevirus.
- 4.-** Detectar cuales fueron los grupos de edad, y Estados de la República Mexicana que fueron afectados en 1990, determinando los meses en que se presentan las infecciones por denguevirus en base a la determinación de los niveles de anticuerpos IgM y anticuerpos I.H.

**4. MATERIAL  
Y  
METODOS**

## MATERIAL.

### a) Material Biológico

- 1.- Sueros de pacientes con diagnóstico probable de dengue enviados por los Centros Regionales de Salud Pública de la República Mexicana al laboratorio de virología del I.N.D.R.E. (229 sueros pareados)
- 2.- Antígenos de dengue utilizados en la prueba de inhibición de la hemaglutinación: DEN-1, DEN-2, DEN-4 y Encefalitis Equina de Venezuela elaborados en el laboratorio de virología del I.N.D.R.E.
- 3.- Antígenos de dengue utilizados en la técnica de MAC-ELISA: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, preparados en los laboratorios del C.D.C. de San Juan, Puerto Rico.
- 4.- Glóbulos rojos de ganso macho, los gansos son mantenidos en el bioterio del I.N.D.R.E.
- 5.- Anticuerpo Anti-IgM humano ( $\mu$ ) catalogo No. 01-10-03 Lab. Kirkgaard D. Pery Laboratories Inc.
- 6.- Anticuerpo monoclonal anti-flavivirus 6B6C-1 conjugado con enzima peroxidasa.
- 7.- Albumina Bovina Fracción V
- 8.- Suero Normal Humano al 15%.

b) MATERIAL DE LABORATORIO.

- 1.- Pipetas estériles de 1, 2, 5, y 10 ml
- 2.- Vasos de precipitado de 50, 150, 250, 500 y 1000 ml
- 3.- Matraces volumétricos de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml
- 4.- Matraces erlenmeyer de 125 y 250 ml
- 5.- Equipo de Microtitulación:
  - Microplacas de poliestireno de 96 pozos fondo "U" Immulon II
  - Pipetas calibradas de 50 y 100  $\mu$ l
  - Microdilutores de 25, 50 y 100  $\mu$ l
- 6.- Tubos de ensayo 13 x 100
- 7.- Tubos graduados para centrífuga
- 8.- Viales de poliestireno de 2 y 5 ml
- 9.- Bulbo de goma y perilla de seguridad
- 10.- Pipetas calibradas de 1,5, 10, 100 y 500  $\mu$ l
- 11.- Caja húmeda
- 12.- Lavador de placas manual

c) APARATOS

- 1.- Balanza analítica (Mettler H 8) y Granataria (OHAUS Harvard trip)
- 2.- Centrífuga refrigerada (DAMON IEC, CO. DPR 6000)
- 3.- Potenciómetro (Beckman Zeromatic ss-3 Mod. 96)
- 4.- Refrigerador a 4°C. ( Lab. Line Instruments, Inc. Frigid Cab)
- 5.- Congeladores a -20 y -70 °C (RHEEM-REVCO- Ultra Low Mod. ULT1185 B-L-K)
- 6.- Vortex. (Vortex Gente 2, Scientific Ind. MOD. G -560)
- 7.- Agitador horizontal para microplacas. ( Minishaker - Dinattech Products Cat. 002-963-0900)
- 8.- Agitador mecánico para tubos. (Dinatech Products)
- 9.- Autoclave. (AMSCO S.A.)
- 10.- Lector de Placas de ELISA con impresora (BEHRING EL311)
- 11.- Impresora de lector de ELISA (STAR DGT MATRIX PRINTER SG-10)
- 12.- Estufa a 37°C

**d) REACTIVOS Y SOLUCIONES**

(Ver preparación Apéndice)

- 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.- Ácido 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.- Solución Amortiguadora de Carbonato pH=9.6
- 11.- Amortiguador de Fosfato ( PBS- ELISA)
- 12.- Leche al 0.5 y 1 % en PBS-ELISA
- 13.- Sustrato : Solución **A** (2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina sulfonato)  
Solución **B** ( $I_2C_2$ )

## METODOLOGIA

### PRUEBA DE ELISA-IgM (MAC-ELISA)

**FUNDAMENTO:** La prueba se fundamenta en la utilización de un anticuerpo anti-IgM humano purificado, que se fija a los pozos de una placa de poliestireno. Posteriormente se agregan los sueros problemas, se incuban y se elimina el exceso de reactivos por lavados, las reacciones Ag (IgM humanas del suero) -Ac (Anti-IgM) que hayan ocurrido no son eliminadas por el lavado y quedan fijas en el pozo. Cuando se añade antígenos de Dengue, ocurrirá una segunda reacción Ag-Ac entre las IgM específica anti-dengue formando otro complejo, el antígeno que queda en exceso es eliminado por lavados, cuando se añade un reactivo capaz de unirse al antígeno reaccionante ( Anticuerpo anti-flavivirus) que previamente ha sido conjugado con una enzima (peroxidasa), este se fija al complejo IgM-Ag. La reacción se revela finalmente con un sustrato de la enzima, que al ser transformado forma un producto colorido, este color puede evaluarse a simple vista o ser cuantificado por medio de un espectrofotómetro ( FIG. No.7)

### TECNICA DE MAC-ELISA

#### 1.- Sensibilización de Microplacas

- a) Diluir anti-IgM humano 1:200 con buffer de carbonatos (pH 9.6)
- b) Colocar en los 60 pozos centrales 100 µl/pozo (100 µl= 0.1 ml)
- c) Guardar las microplacas en caja húmeda a 4°C durante toda la noche.

#### 2.- Prevención de Reacción no específica.

- a) Lavar microplacas 5 veces con PBS-ELISA.
- b) Colocar solución de bloqueo (Leche al 0.5% en PBS 300 µl/pozo.)
- c) Incubar a temperatura de sala por 15-30 min.

**3.- Reacción con muestra de suero.**

- a) Lavar 5 veces con PBS.
- b) Diluir las muestras 1:20 o 1:40 con leche al 0.5% en PBS-ELISA
- c) Colocar las muestras (Incluso controles positivo y negativo) 50 µl/pozo.
- d) Incubar las microplacas a 37°C por 2 horas, en caja húmeda.

**4.- Reacción con antígeno.**

- a) Lavar 5 veces las placas con PBS.
- b) Diluir los antígenos (16 UHA/ 50 µl) con suero normal humano se puede preparar una mezcla de 4 antígenos (DEN 1,2,3,4)
- c) Colocar 50 µl de antígeno /pozo.
- d) Incubar a temperatura de 37°C por 2 horas en caja húmeda.

**5.- Reacción con Conjugado.**

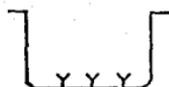
- a) Lavar las placas 5 veces con PBS.
- b) Diluir el conjugado 1: 5000 (Anticuerpo humano antiinflavirus conjugado con enzima peroxidasa) usando Suero Normal Humano (SNH) al 15 % como diluyente
- c) colocar 25 µl/pozo
- d) Incubar por 1 hora a 37°C usar caja húmeda

**6.- Reacción con Sustrato.**

- a) Lavar 5 veces con PBS
  - b) Mezclar igual cantidad de solución A y solución B, colocar 100 µl/pozo
  - c) Incubar 30 min a 37°C
  - d) Incubar 2 horas mas a temperatura de sala
- 7.- Leer en lector de ELISA a 410 nm o en forma visual escoger pozos positivos aquellos que presenten color Azul-Verdoso.  
Valores de Densidad Optica (D.O)  $\leq 0.050$  se consideran negativos  
Valores de Densidad Optica (D.O)  $> 0.050$  se consideran positivos

**Deben Montarse los siguientes contralos:**

- a) Suero control Positivo: Suero positivo alto  
Suero positivo medio  
Suero positivo bajo
  - b) Suero control Negativo \*
  - c) Control de pozo solo con Antígeno + sustrato \*
  - d) Control de pozo solo con Anti-IgM + sustrato \*
  - e) Control de pozo para cada suero problema + sustrato \*
  - f) Control de pozo solo con sustrato
- \* En estos controles no debera haber desarrollo de color



1.- Anti-IgM adsorbida a la placa



2.- Bloqueo de sitios inespecíficos con solución de leche al 0.5 %



3.- Adición del suero problema



4.- Adición del antígeno de referencia



5.- Adición del anticuerpos anti-flavivirus humano conjugado con la enzima peroxidasa.



6.- Adición del sustrato de la enzima.

**FIGURA No. 7 ESQUEMA DE LA TECNICA DE MAC-ELISA.**

## PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

**FUNDAMENTO:** La hemaglutinación viral es el agrupamiento de glóbulos rojos con virus debido a algunas propiedades específicas del virus como son hemaglutinación, neurotropismo, unión a receptores. 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 la hemaglutinación. (13)

La hemaglutinación es inhibida por anticuerpos específicos. La prueba de inhibición de la hemaglutinación es usada para identificar, demostrar inmunidad y para estudiar reacciones antigénicas entre virus. (13)

### 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 1500 rpm durante 15 minutos.
- 5.- Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 8%
- 6.- A partir de esta suspensión, se prepara otra de glóbulos rojos 1:24 usando como diluyente los PBS's de pH's diferentes (6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0).

## 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 adicionan:

Suero a probar..... 0.2 ml

Borato salino pH=9..... 0.8 ml

Kaolín al 25% ..... 1.0 ml

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

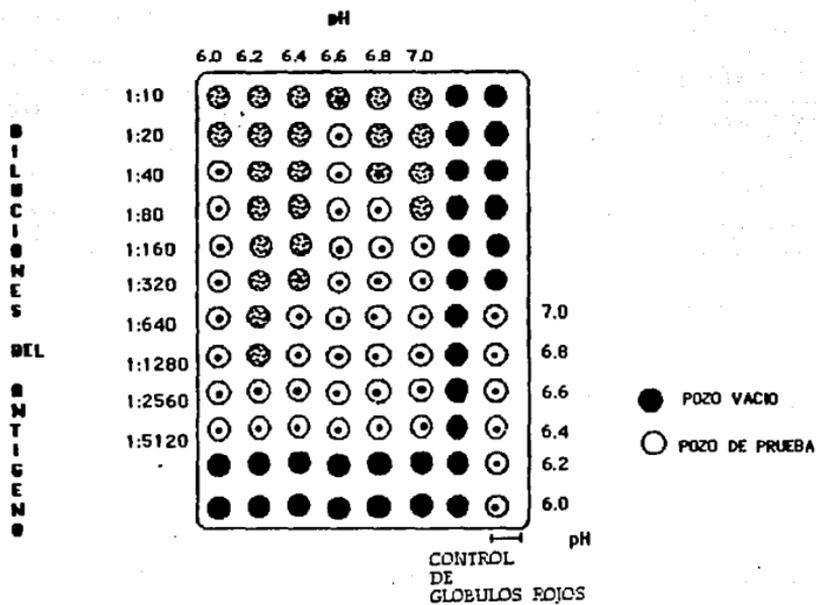
- 2.- Centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos
- 3.- Decantar el sobrenadante y adicionar una gota (0.1 ml aproximadamente) del paquete celular de glóbulos rojos de ganso, mezclar.
- 4.- Se colocan los tubos 20 minutos a 4°C, con agitación ocasional.
- 5.- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C.
- 6.- Decantar el sobrenadante. El sobrenadante es una dilución 1:10 del suero original.

## C) Titulación del antígeno: (H.A.)

- 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 Fig 8.**

Adicionar 0.1 ml (100 µl) de la dilución del antígeno 1:10 al primer pozo; del segundo pozo en adelante agregar 0.05 ml (50 µl) de BABS. Utilizando microdilutores de 50 µl hacer las diluciones, pasando del primer pozo al segundo y a través de todos los pozos restantes. Descartar los 50 µl del último pozo.

- 3.- Agitar la placa.



**FIG.No. 8 PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (Titulación de antígeno)**

- 4.- Preparar los glóbulos rojos de ganso en los diferentes pH's (suspensión 1:24) y adicionar 50  $\mu$ l a cada pozo.
- 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 del antígeno que muestra una hemaglutinación completa.

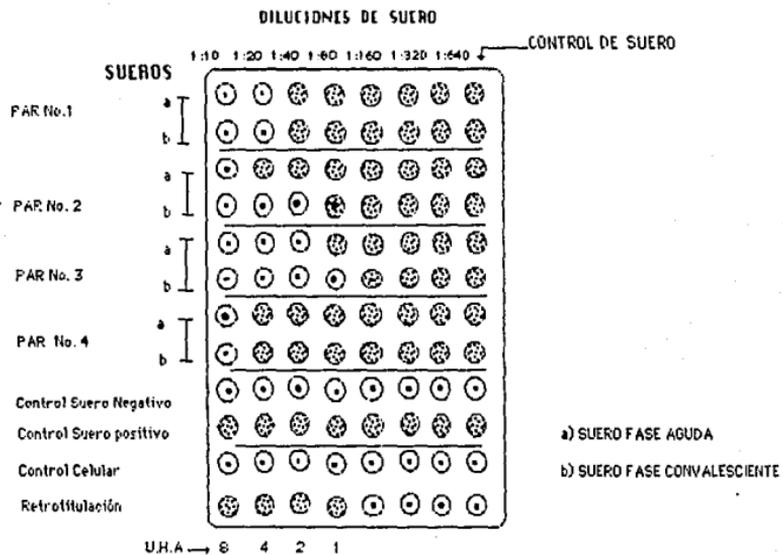
#### 7.- Interpretación: PATRONES DE HEMAGLUTINACION

**Hemaglutinación completa:**      **Hemaglutinación parcial:**      **Hemaglutinación negativa**



#### D) TITULACION DE ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMAGLUTINACION:

- 1.- Marcar las placas con el número de suero y el antígeno a probar. **Ver Fig 9.**
- 2.- Colocar 0.05 ml (50  $\mu$ l) del suero tratado en el primer y último pozo, del segundo pozo al último agregar 0.025 ml (25  $\mu$ l) de BABS. Realizar las diluciones utilizando microdilutores de 25  $\mu$ l.
- 3.- Adicionar a cada pozo 25  $\mu$ l de antígeno (diluido lo necesario para contener de 4 a 8 UHA/25  $\mu$ l), agitar la placa en un agitador mecánico horizontal para microplacas.
- 4.- Cubrir la placa e incubar a 4°C toda la noche.
- 5.- Al día siguiente, se colocan las placas a temperatura ambiente y se prepara la suspensión de glóbulos rojos de ganso 1:24 en el pH óptimo; se agrega 0.05 ml (50  $\mu$ l) 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.



**FIG. No 9 PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION**

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).

8.- Patrones de Hemaglutinación:

**Hemaglutinación completa:**    **Hemaglutinación parcial:**    **Hemaglutinación negativa:**



Deben montarse los siguientes controles:

- a) Retrotitulación del antígeno
- b) Suero homólogo positivo para cada antígeno (control positivo).
- c) Control de glóbulos rojos de ganso para cada suero.
- d) Control de glóbulos rojos de ganso, sin suero y sin antígeno.

9.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE I.H.

I.- Muestra Negativa: No hay anticuerpos detectables.

II.- Muestra Positiva:

- a) Respuesta Primaria (Infección reciente): Cambio en cuatro veces ó más en el título de anticuerpos en el suero de fase convalescente con respecto al suero de fase aguda, con respuesta monotípica a un solo serotipo de dengue.

- b) **Respuesta Secundaria (Infección reciente):** Cambio en cuatro veces ó más en el título de muestras pareadas a dos ó más serotipos de dengue, títulos mayores o iguales a 1: 640
- c) **Respuesta Secundaria ( Infección pasada):** Títulos estables en sueros pareados, de 1: 20 a 1:320 sin incremento de 4 veces para uno o varios antígenos de dengue considera negativo.
- d) **No concluyentes :** cambios en los títulos de 1 : 10 a 1: 20 para uno ó más antígenos de dengue , se requiere de otra muestra posterior a la tomada en fase convalescente

## 5. RESULTADOS

Se recibieron en el laboratorio de virología diagnóstica del I.N.D.R.E. aproximadamente 2800 muestras para diagnóstico de dengue, durante el período de enero a diciembre de 1990, de estas muestras se tomaron aquellas que presentaban buen estado ( No hemolizadas, no contaminadas, suficiente volumen), además de que estuvieran acompañadas de su historia clínica respectiva, detallando en ella los principales datos de las muestras ( Procedencia, síntomas y signos clínicos compatibles con dengue o fiebre hemorrágica de dengue, edad, fecha de inicio de la enfermedad y fecha de toma de la muestra). De estas muestras se seleccionaron solo 229 sueros pareados (sueros en fase aguda y sueros en fase convalescente tomados con 15 a 20 días después del inicio de la sintomatología, aunque se presentaron casos en los que hubo sueros hasta con 40 días de evolución, dando un total de 458 sueros), para ser procesadas por las técnicas de MAC- ELISA y de inhibición de la hemaglutinación esto en base a las posibilidades de material, equipo y reactivos del laboratorio.

La tabla **No. 1** muestra los resultados obtenidos por MAC-ELISA y su positividad encontrada en base a los días de evolución clínica del paciente, la figura **No.10** representa la positividad encontrada en 286 sueros colectados con 2 a 42 días de evolución clínica detectados por la técnica de MAC-ELISA para diagnóstico de dengue, además de mostrar la variación de esta positividad en base al tiempo de evolución de la enfermedad.

La tabla **No. 2** muestra los resultados obtenidos por las técnicas de MAC-ELISA e I.H. en 229 casos y la frecuencia en los títulos de anticuerpos IgM detectados por ELISA en comparación con los títulos de anticuerpos I.H.

La tabla **No. 3** muestra los resultados obtenidos por las técnicas de MACELISA e I.H. y la distribución de seropositividad y seronegatividad de acuerdo a grupos de edad.

La tabla **No. 4** reúne los resultados obtenidos por las técnicas de MAC-ELISA y de Inhibición de la Hemaglutinación (I.H.) y las frecuencias de seropositividad y seronegatividad, además de la distribución de estos resultados en 13 estados de la República Mexicana que remitieron muestras para diagnóstico de dengue en 1990 al laboratorio de virología del INDRE.

La Tabla **No. 5** reporta los resultados que se obtuvieron por las técnicas de MAC-ELISA e I.H. y la frecuencia de seropositividad y seronegatividad de acuerdo al mes de inicio, la figura **No. 11** nos muestra la positividad encontrada por ambas técnicas y las frecuencias que se obtuvieron según el mes de presentación de la enfermedad.

La tabla **No. 6** muestra las principales ventajas observadas de MAC-ELISA sobre la prueba de I.H.

**TABLA No. 1**  
**POSITIVIDAD ENCONTRADA EN 286 SUELOS COLECTADOS CON 2 a 42 DIAS**  
**DE EVOLUCION CLINICA ESTUDIADOS POR MAC-ELISA. MEXICO 1990**

<b>DIAS DEVOLUCION</b>	<b>NO. CASOS *</b>	<b>NO CASOS POSITIVOS</b>	<b>%POSITIVIDAD</b>
2	20	4	20
6	57	21	36
8	32	29	90.6
10	51	46	90.1
14	26	21	80.7
18	30	27	90
22	21	19	90.4
26	16	14	87.5
30	12	10	83.3
32	6	5	83.3
34	5	4	80
36	0	0	0
38	6	3	50
40	0	0	0
42	4	1	25
	<b>286</b>	<b>204</b>	

\* Sueros de fase aguda y fase convalescente

**TABLA No 2**  
**COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgM Y ANTICUERPOS I.H.**  
**EN 229 CASOS ESTUDIADOS EN 1990**

	No. CASOS	TITULO DE Ac I.H. 1a MUESTRA	TITULO DE Ac I.H. 2a. MUESTRA	TITULO DE Ac. IgM (D.O.) *
	3	<10	<10	0.001
	2	<10	<10	0.005
	4	<10	<10	0.009
	5	<10	<10	0.012
	2	<10	<10	0.018
<b>VALORES</b>	5	<10	<10	0.021
<b>BAJOS</b>	4	<10	<10	0.023
	2	<10	<10	0.027
	2	<10	<10	0.031
	2	<10	<10	0.035
	1	40	320	0.038
	1	80	640	0.041
	4	<10	<10	0.046
	2	<10	<10	0.050
	5	<10	<10	0.057
	3	<10	<10	0.063
	1	<10	<10	0.069
	4	<10	<10	0.073
	3	<10	<10	0.081
	4	<10	<10	0.085
	3	<10	<10	0.088
	5	<10	<10	0.093
	2	<10	<10	0.098
	3	<10	<10	0.101
	1	<10	<10	0.104
	6	<10	10	0.118
	2	<10	10	0.125
	4	<10	10	0.139
	3	10	40	0.171
	2	<10	10	0.201
	3	<10	10	0.233
<b>VALORES</b>	1	10	80	0.257
<b>MEDIOS</b>	3	<10	10	0.281
	1	<10	40	0.290
	5	10	160	0.301
	4	<10	10	0.319
	2	40	160	0.322
	5	10	80	0.341

**TABLA No 2 Continúación**  
**COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS I<sub>g</sub>M Y ANTICUERPOS I<sub>g</sub>G**  
**EN 229 CASOS ESTUDIADOS EN 1990**

<b>VALORES</b>	2	10	160	0.380
<b>MEJORES</b>	1	<10	10	0.395
	4	40	160	0.401
<b>Continúación</b>	2	<10	80	0.489
	6	40	160	0.493
	3	10	320	0.501
	2	10	40	0.506
	3	10	160	0.511
	2	40	640	0.541
	2	10	640	0.549
	1	160	640	0.631
	3	80	>640	0.675
	3	160	640	0.693
	1	10	320	0.750
	2	10	160	0.812
	1	10	640	0.849
<b>VALORES</b>	2	40	>640	0.971
<b>ALTOS</b>	3	10	640	0.987
	1	10	320	0.995
	1	40	>640	1.086
	2	10	640	1.121
	1	<10	>640	1.124
	2	80	>640	1.208
	1	10	320	1.217
	3	10	>640	1.340
	2	10	640	1.525
	2	40	>640	1.611
	1	<10	80	1.691
	3	<10	>640	1.895
	2	10	640	1.899
	2	40	640	1.901
	1	<10	160	1.941
	3	10	>640	2.003
	1	10	>640	2.019

\* SE TRABAJÓ CON LA 2ª MUESTRA EN MAC-ELISA DEBIDO A QUE EL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD AUMENTA EN ESTAS MUESTRAS POR LA TECNICA DE MAC-ELISA

**TABLA No. 2 Continuación**  
**Muestras que mantuvieron el mismo título en la 1ª y 2ª muestra por I.H.**  
**y que fueron negativas por MAC-ELISA**

No. CASOS	TITULO DE Ac I.H.		TITULO DE Ac. IgM (D.O.) *
	1ª MUESTRA	2ª. MUESTRA	
3	10	10	0.001
2	10	10	0.018
1	40	40	0.009
2	10	10	0.009
1	160	160	0.009
2	10	10	0.021
1	80	80	0.021
2	40	40	0.021
2	10	10	0.041
2	20	20	0.041
1	40	40	0.041
1	80	80	0.001
1	40	40	0.002
1	80	80	0.027
3	40	40	0.027
1	10	10	0.038
2	40	40	0.038
3	40	40	0.018
4	80	80	0.018
1	160	160	0.018
1	40	40	0.031
1	10	10	0.046
2	10	10	0.023
1	40	40	0.023

**TOTAL**                    **229**

\* SE TRAE AJÓ CON LA 2ª MUESTRA EN MAC-ELISA DEBIDO A QUE EL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD AUMENTA EN ESTAS MUESTRAS POR LA TÉCNICA DE MAC-ELISA

**TABLA NO. 3**  
**CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE POR LAS TECNICAS DE**  
**MAC-ELISA Y/O DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION**  
**EN 156\* CASOS, POR GRUPO DE EDAD. MEXICO 1990**

GRUPOS DE EDAD (años)	No. CASOS ESTUDIADOS	I.H. †		MAC-ELISA ‡	
		NEGATIVOS <sup>a</sup>	POSITIVOS	NEGATIVOS <sup>b</sup>	POSITIVOS
1 - 10	21	10	11	6	15
11 - 20	33	15 (7)	18	12	21
21 - 30	30	17 (12)	13	13	17
31 - 40	28	8 (6)	20	5	23
41 - 50	29	19 (1)	10	17	12
51 - 60	7	1	6	2	5
61 - 76	8	5 (2)	3	5	3
<b>TOTALES</b>	<b>156</b>	<b>75 (28)</b>	<b>81</b>	<b>60</b>	<b>96</b>

<sup>a</sup> Títulos negativos <10 en 1ª y 2ª muestra

( ) Sueros que mantuvieron en su 2ª muestra el mismo título de la 1ª, infección pesada y que fueron detectados como negativos por Mac-ELISA.

<sup>b</sup> IgM-ELISA negativos aquellas muestras que mostraron con una D.O.  $\leq 0.050$

† Se trabajaron muestras pareadas

‡ Se trabajaron muestras únicas.

\* 156 de 229 casos totales presentaron el dato de edad en su historia clínica, todas son muestras

Tabla No. 4.

RESULTADOS OBTENIDOS POR LAS TÉCNICAS DE MAC - ELISA E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN EN 229\* CASOS PARA DIAGNÓSTICO DE DENGUE EN 13 ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA. MÉXICO 1990

ESTADOS	No. CASOS ESTUDIADOS	I.H. †		MAC-ELISA ‡	
		NEGATIVOS †	POSITIVOS	NEGATIVOS ‡	POSITIVOS
COLIMA	2	0	2	0	2
NAYARIT	4	1	3	0	4
JALISCO	21	15 (5)	6	6	15
MICHOACAN	6	4	2	2	4
VERACRUZ	28	10	18	8	20
TABASCO	5	2	3	3	2
Q.ROO	1	0	1	0	1
SONORA	7	1	6	1	6
NUEVO LEON	33	11 (4)	22	6	27
TAMAULIPAS	50	27 (9)	23	19	31
SLP	14	3	11	2	12
PUEBLA	50	40 (21)	10	32	18
EDOMEXICO	8	0	8	1	7
<b>TOTALES</b>	<b>229</b>	<b>114 (41)</b>	<b>115</b>	<b>80</b>	<b>149</b>

† Títulos negativos <10 en 1a y 2a muestra

( ) Sueros que mantuvieron en su 2a muestra el mismo título de la 1a, infección pasada y que fueron detectados como negativos por Mac-ELISA.

‡ IgM-ELISA negativos aquellas muestras que mostraron con una D.O.  $\leq 0.050$

† Se trabajaron muestras pareadas

‡ Se trabajaron muestras únicas.

\* 229 SUEROS PAREADOS ( 1a y 2a Muestras)

**TABLA No. 5**

NUMERO DE CASOS POSITIVOS ENCONTRADOS POR LAS TECNICAS DE  
MAC-ELISA Y DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION EN 164\*  
CASOS DE ACUERDO AL MES DE INICIO. MEXICO 1990

MES	No. CASOS		I.H.†		MAC-ELISA ‡	
	ESTUDIADOS	NEGATIVOS a	POSITIVOS	NEGATIVOS b	POSITIVOS	
ENERO	32	23 (16)	9	20	12	
FEBRERO	17	11 (3)	6	11	6	
MARZO	3	1	2	0	3	
ABRIL	3	3 (1)	0	3	0	
MAYO	3	3	0	0	3	
JUNIO	0	0	0	0	0	
JULIO	10	6 (2)	4	1	9	
AGOSTO	12	6	6	4	8	
SEPTIEMBRE	35	15 (4)	20	8	27	
OCTUBRE	28	16 (5)	12	7	21	
NOVIEMBRE	21	7 (3)	14	2	19	
DICIEMBRE	0	0	0	0	0	
<b>TOTALES</b>	<b>164</b>	<b>91 (34)</b>	<b>73</b>	<b>56</b>	<b>108</b>	

a Titulos negativos <10 en 1a y 2a muestra

( ) Sueros que mantuvieron en su 2a muestra el mismo título de la 1a, infección pasada y que fueron detectados como negativos por Mac-ELISA.

b IgM-ELISA negativos aquellas muestras que mostraron con una D.O.  $\leq 0.050$

† Se trabajaron muestras pareadas

‡ Se trabajaron muestras únicas.

\* 164 de 229 casos totales presentaron el dato de mes de inicio en su historia clínica todas son muestras pareadas.

**TABLA No. 6**  
**COMPARACION DE LAS TECNICAS DE MAC-ELISA e**  
**INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION**

<b>MAC-ELISA</b>	<b>I.H.</b>
<p>Tiempo de duración y obtención de resultados 6 a 7 hrs</p> <p>Se requiere de 1 muestra</p> <p>No requiere de tratamiento previo del suero se utiliza suero completo</p> <p>Se pueden trabajar hasta 60 muestras por placa y hasta 500 muestras por semana</p> <p>No requiere de el mantenimiento de animales de granja</p> <p>El suero se maneja con una sola dilución</p>	<p>Tiempo para obtener resultados 2 días</p> <p>Se requiere de 2 muestras:  Muestra fase aguda  Muestra fase convalescente</p> <p>Requiere de una extracción previa con kaolín y absorción con glóbulos rojos de ganso para extraer inhibidores inespecíficos de aglutinación</p> <p>se trabajan solo 10 muestras por placa máximo hasta 200 por semana</p> <p>requiere el mantenimiento de animales de granja ( gansos)</p> <p>se requiere de mayor número de diluciones mayor gasto de reactivos.</p>

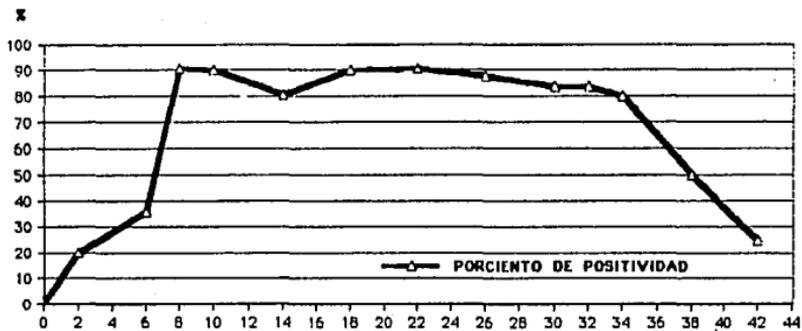
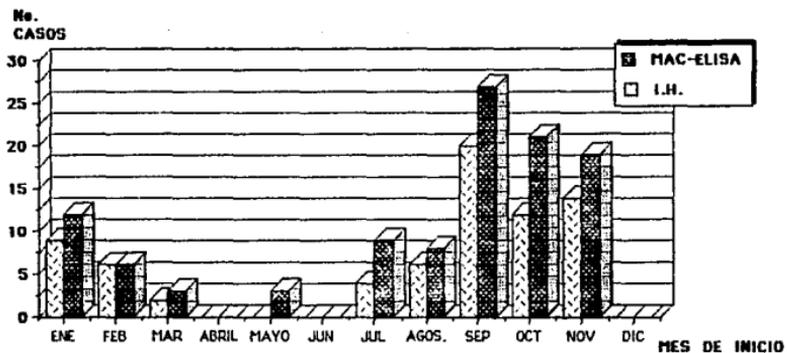


FIGURA No. 10  
 POSITIVIDAD ENCONTRADA POR LA TECNICA DE MAC-ELISA  
 EN 286 CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE CON 2 - 42 DIAS  
 DE EVOLUCION CLINICA. MEXICO 1990

DIAS



**FIGURA No. 11**  
**FRECUENCIA DE POSITIVIDAD ENCONTRADA POR MAC-ELISA**  
**Y/O INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION EN 164 CASOS**  
**ESTUDIADOS DE ACUERDO AL MES DE INICIO . MEXICO 1990**

## 6. D I S C U S I O N

Con la finalidad de encontrar una alternativa al diagnóstico serológico de infecciones causadas por el virus del dengue en México, el presente trabajo fué un estudio comparativo entre las técnicas de ELISA en su modalidad de captura de IgM (MAC-ELISA), y la técnica de inhibición de la hemaglutinación (I.H.) la cual es la técnica de rutina para diagnóstico serológico de dengue, y que se viene realizando en el laboratorio de Virología Diagnóstica del I.N.D.R.E. que es el centro de referencia en el país para la investigación epidemiológica y diagnóstico de dengue en México.

En la primera fase del estudio se seleccionó una población de 229 sueros pareados (458 sueros en total), provenientes de los centros de salud de diferentes estados de la República Mexicana, que en el año de 1990 remitieron estas muestras al I.N.D.R.E. para su diagnóstico y confirmación de dengue.

La técnica de MAC-ELISA nos dió la ventaja de que con una sola muestra se pudo confirmar el diagnóstico, siendo esto una gran ventaja sobre I.H. con esto los laboratorios de referencia tendrían una gran ayuda, ya que se tiene la experiencia en el I.N.D.R.E. de que en muchos casos una segunda muestra no es enviada al laboratorio, o que es tomada con mas de 2 semanas después del inicio de la enfermedad, cuando el nivel de anticuerpos I.H. probablemente ha decrecido dandonos resultados falsos negativos. Se hizo necesario determinar cual es el momento adecuado para la toma de la muestra para su uso por MAC-ELISA, la tabla **No. 1** nos muestra que de 286 sueros (considerando dentro de estos sueros de fase aguda y sueros de fase convalescente), se determinó que la positividad de estos sueros se eleva hasta un 90 % a partir del 8° día de evolución manteniéndose con poca variación hasta el día 26 en que los niveles empiezan a declinar en la **Fig No 10** se muestra de manera gráfica el comportamiento de estos resultados y cual fué la positividad por MAC-ELISA en base a los días de evolución clínica de la

enfermedad, estudios realizados por Innis y col. (39) indican que del 6° al 10° día en el 90 % de los casos aparecieron IgM detectables por ELISA, de tal modo se determinó que a partir del 8° día es el idóneo para la toma de la muestra. En el caso de muestras tomadas con menos de 8 días de evolución clínica, estas pueden ser utilizadas para tratar de lograr el aislamiento del virus por alguno de los métodos ya mencionados en las generalidades, estas muestras no son de utilidad para un diagnóstico serológico por la técnica de MAC-ELISA, debido a que como lo muestran nuestros resultados el porcentaje de positividad es muy bajo en esos días dándonos posibles resultados negativos, al igual las muestras tomadas después del día 26 de evolución clínica no son útiles para el diagnóstico de dengue por MAC-ELISA.

En la tabla No. 2 se muestran las frecuencias de títulos obtenidos por MAC-ELISA (D.O.) en comparación con los títulos obtenidos por I.H. en 229 casos estudiados en 1990, los resultados son consistentes con la observación de que los anticuerpos IgM detectados por ELISA aparecen en paralelo con los anticuerpos I.H. además se observa que valores bajos, medios y altos son similares en ambas técnicas aunque no necesariamente esto quiere decir que por ejemplo un valor de densidad óptica de 0.500 corresponda o se asocie exactamente a un valor de 1:160 de I.H. tal como se observa en nuestros resultados. Observamos que en títulos de I.H. en los que no hay variación en la 1a y 2a muestra, aunque detectamos anticuerpos presentes por la técnica de I.H. la técnica de MAC-ELISA no detectó estos, dando valores de Densidad óptica negativos ( $\leq 0.050$ ), podemos discutir esto a que los anticuerpos detectados por I.H. son de una infección primaria pasada, posiblemente de isotipo IgG no detectable por MAC-ELISA.

Debido a que el número de sueros trabajados es limitante para cada caso (Grupo de edad, mes de inicio, estado de la República) se optó por hablar de frecuencia de positividad que para este estudio nos dió una mejor perspectiva y mas

real de lo que sucede con la enfermedad del dengue en México, no se maneja el porcentaje de positividad ya que los resultados que se hubiesen obtenido en este trabajo contrastarían con los resultados que emite la Dirección General de Epidemiología (D.G.E.) hasta el año de 1990, dando un panorama falso de lo que sucede con esta enfermedad en nuestro país. Sugerimos en este trabajo la importancia de seleccionar, bajo criterios epidemiológicos establecidos, un número de muestras adecuado y de este modo manejar los porcentajes de positividad y negatividad que indicarían el comportamiento y diseminación de la enfermedad a nivel nacional.

Al determinar la distribución de nuestros resultados obtenidos por MAC-ELISA e I.H. de acuerdo a Grupo de edad, Mes de aparición de la enfermedad y Entidad federativa, detectamos que al comparar estos resultados se observó que en el caso de grupo de edad Tabla No. 3 MAC-ELISA detectó un mayor número de casos positivos 96/156 (61.5%) mientras que I.H. detectó 85/156 (51.9%) observamos que los grupos mas afectados son el grupo de 11 a 20 años y de 21 a 30 años, lo que indicó que en 1990 estos grupos de edad son los de mayor riesgo a infecciones por dengue.

En el caso de los estados de la República Mexicana, Tabla No. 4 los resultados obtenidos por MAC-ELISA indicaron que 149 de 229 casos resultaron positivos (65.05%) mientras que por I.H. solo detectó 115 de 229 casos positivos (50.2%), siendo los estados de Jalisco, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas y Puebla los mas afectados en 1990, pero sin descartar que los 7 estados restantes puedan estar en riesgo de presentar mayor número de casos positivos y además se hace necesario que en esos estados se tenga una mayor vigilancia de la enfermedad para evitar el riesgo de brotes de las formas graves.

La tabla No. 5 muestra que los meses de Enero, Septiembre, Octubre y Noviembre son los meses en los que se detectó un mayor número de casos positivos siendo meses en los que debido a la época del año, el clima se hace propicio para el desarrollo del mosquito *Aedes aegypti* y por lo cual se debe tener mayor vigilancia y control de esta enfermedad, por MAC-ELISA se determinaron 108 de 164 casos (65.85%) mientras que por I.H. solo 73 de 164 (44.5%), la Fig. No. 11 nos representa gráficamente estos resultados mostrándonos el comportamiento de la enfermedad durante el año de 1990.

Basados en reportes y datos emitidos por la D.G.E. hasta enero de 1991, nuestros resultados obtenidos por ambas técnicas indican el comportamiento real de la enfermedad en cada caso. (80)

Los resultados obtenidos muestran una mayor seropositividad obtenida por MAC-ELISA, en comparación con la obtenida por I.H. esto nos indica que MAC-ELISA resultó ser más sensible que I.H.; existe la crítica hecha con respecto a la sensibilidad de MAC-ELISA en el sentido de que no es comparable con la sensibilidad de I.H. por el hecho de que MAC-ELISA determina solo IgM mientras que I.H. tanto IgM como IgG, pero basándonos en conclusiones y estudios hechos por Ditmar (10), que indican que MAC-ELISA resultó más sensible que I.H. ya que solo un título de 1:10 resultó positivo por I.H. mientras que por ELISA dió valores positivos hasta una dilución de 1:200 con ese mismo suero. En nuestro estudio hubo sueros que en la dilución 1:10 resultaron ser negativos por I.H. mientras que por MAC-ELISA mostraron ser positivos a la dilución 1:40. El % de positividad de MAC-ELISA e I.H. no se pudo determinar ya que no se contó con los datos que nos dieran el número de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, y falsos negativos ya que para ello necesitamos que mediante un aislamiento viral de cada muestra, nos indicara los parámetros antes mencionados, para determinar el %

de Sensibilidad y Especificidad de ambas técnicas. La razón de no contar con estos datos es que en el laboratorio de virología no se realiza la técnica de aislamiento viral como rutina en los sueros enviados. Solo un número de pequeño de muestras de nuestra población de sueros (68 sueros ) se obtuvo aislamiento viral.

En nuestro trabajo se presentaron 2 casos en los que muestras positivas a I.H. fueron negativas e MAC-ELISA esto se debe a que estos sueros presentan infecciones secundarias (anticuerpos de isotipo IgG) que no son detectados por MAC-ELISA. De igual manera hubo casos en los que muestras positivas a MAC-ELISA fueron negativas a I.H. aunque con valores de densidad óptica no mayores de 0.100 MAC-ELISA detectó anticuerpos IgM presentes en esos sueros, estos resultados nos indican una mayor sensibilidad de MAC-ELISA sobre I.H.

Se realizaron ambas técnicas, en base a la metodología planteada para cada una de ellas, se contó con la infraestructura necesaria en el laboratorio de arbovirus del I.N.D.R.E. para la realización de la técnica de MAC-ELISA, posteriormente se determinaron las ventajas de MAC-ELISA sobre I.H. tabla No. 6, la importancia de MAC-ELISA no radicó no solo en la parte técnica de la misma, se determinó que la detección de anticuerpos IgM a partir de una muestra sérica nos provee de la siguiente información, al ser producidos primeramente los anticuerpos IgM aunque de poca duración dan una evidencia serológica temprana de una infección en curso, adicionalmente de que los anticuerpos IgM muestran poca reactividad cruzada con otros serotipos (14,25); la confirmación reciente es necesaria no solo para fines epidemiológicos sino para casos de emergencia, vigilancia, control y prevención de posibles infecciones secundarias que desencadenen manifestaciones hemorrágicas (Formas graves del dengue).

La definición del panorama serológico de dengue en nuestro país es muy pobre la vigilancia serológica tiene diversas limitantes, la infraestructura de laboratorios para el diagnóstico de dengue se limita al Nacional Referencia en el I.N.D.R.E. el sistema de toma y envío seguirán siendo insuperables mientras exista la centralización del diagnóstico en la Ciudad de México donde el problema de dengue no existe. Nuestro trabajo nos da la pauta ha pensar que la técnica de MAC-ELISA es una opción a descentralizar el diagnóstico y una de varias soluciones a los problemas antes planteados.

Una parte fundamental de este estudio radica también en que es importante el comparar los respectivos avances, limitaciones y peligros con los métodos convencionales para una mejor interpretación de los resultados. Por otro lado muchos centros de investigación, como el laboratorio de Virología Diagnóstica del I.N.D.R.E. los cuales trabajan en la obtención de los reactivos utilizados en la técnica de ELISA hacen pensar que en el futuro la técnica será más barata y por consiguiente más accesible a los laboratorios de diagnóstico clínico en los diferentes centros regionales de salud del país.

## 7. CONCLUSIONES

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 1.- Se realizó la técnica de MAC-ELISA conjuntamente con la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación en el laboratorio de Arbovirus del I.N.D.R.E. determinando que es posible implementar la técnica de MAC-ELISA como prueba de rutina para el diagnóstico de infecciones por el virus del Dengue en México.
- 2.- Se compararon las técnicas de MAC-ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación (I.H.) utilizadas en el diagnóstico de infecciones por virus del Dengue, podemos concluir que la principal utilidad de la prueba de MAC-ELISA sobre I.H. resultó por su mayor sensibilidad, debido a su fácil desarrollo permitió un mayor número de valoraciones, el diagnóstico se logró con una muestra y no requiere de un tratamiento previo del suero.
- 3.- Podemos concluir que la importancia en la determinación de anticuerpos IgM específicos anti-dengue detectados por MAC-ELISA, está en que es una prueba que sirva como una medida de prevención y control de infecciones secundarias en zonas afectadas por denguevirus, se determinó que la fecha de toma de la muestra para MAC-ELISA debe ser del 8° día y hasta el día 26° de evolución clínica de la enfermedad, para obtener una mayor confiabilidad en los resultados.
- 4.- En base a una frecuencia de positividad se determinaron los niveles de anticuerpos IgM anti-dengue detectados por la prueba de ELISA y anticuerpos detectados por I.H. de acuerdo al grupo de Edad, Estados de la República y Mes de aparición de la enfermedad durante el año de 1990, encontrándose que en ese año, los grupos de 11 a 20 y 21 a 30 años fueron los mas afectados, los estados de Jalisco, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas y Puebla fueron los que tuvieron mayor índice de seropositividad, y siendo los meses de enero, septiembre, octubre, y noviembre donde hubo mayor número de casos positivos.

## 8. A P E N D I C E

## APENDICE

### PREPARACION DE SOLUCIONES

#### 1.- Acido Bórico

Acido bórico_____	30.92 g
Agua destilada Caliente_____	700 ml
Agua destilada c.b.p._____	1000 ml

#### 2.- Albúmina bovina 4% (fracción V) BABS

Albúmina bovina _____	4.0 g
Borato salino pH= 9._____	100 ml

Estерilizar por filtración

#### 3.- Solución de Alsever's

Dextrosa_____	20.5 g
Cloruro de sodio_____	42 g
Acido cítrico_____	0.55 g
Citrato de sodio_____	8.0 g
Agua destilada_____	1000 ml

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

#### 4.- 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
Aguadestilada c.b.p _____	1000 ml

5.- Cloruro de sodio 1.5 M

Cloruro de sodio	_____	87.68 g
Agua bidestilada	_____	1000 ml

7.- 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 c.b.p	_____	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 min.

8.- Fosfato de sodio dibásico 2.0 M

Fosfato de sodio dibásico anhidro	_____	283.96 g
Agua destilada	_____	1000 ml

9.- Fosfato de sodio monobásico 2.0 M

Fosfato de sodio monobásico	_____	276.02 g
Agua destilada	_____	1000 ml

10.- 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

11.- 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

13.- Tabla de valores de pH (Buffers para la prueba de IHA)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M - NaCl 0.15 M	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 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 mezclas de volúmenes iguales de borato salino pH= 9 y el buffer elegido

14.- Kaolín al 25%

Kaolín, lavado ácido \_\_\_\_\_ 25 g  
Borato salino pH = 9 \_\_\_\_\_ 100 ml  
Mantener en agitación durante 30 min.

15.- Buffer de Carbonatos.

Solución A: Bicarbonato de sodio 1.0 M \_\_\_\_\_ 84 g / 1000 ml agua  
Solución B: Carbonato de sodio 1.0 M \_\_\_\_\_ 100 g / 1000 ml agua

Agregar 45.3 ml de sol. A con 182 ml de solución B.

Añadir agua destilada c.b.p. 1000 ml

Ajustar pH a 9.6

16.- Amortiguador de fosfatos (PBS) de ELISA.

NaCl \_\_\_\_\_ 8 g  
KCl \_\_\_\_\_ 0.2 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0.91 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 0.14 g  
Agua destilada \_\_\_\_\_ 1000 ml

17.- Leche para bloqueo 0.5 %

Leche sin grasa, deshidratada (Carnation) \_\_\_\_\_ 5 g  
Amortiguador PBS-ELISA \_\_\_\_\_ 1000 ml

**18.- Suero Normal Humano (SNH).**

- a) Obtener suero de personas (suero negativo a Dengue) se ponen 10 ml en un vaso de precipitado de 2000 ml**
- b) Añadir 500 ml de acetona y agitar por 15 minutos a temperatura ambiente**
- c) Inclinar el vaso y dejarlo así hasta el otro día.**
- d) Se forma un precipitado en el vaso, retirar el sobrenadante (Acetona) con una bomba de vado.**
- e) Agitar y esparcir el precipitado (de proteínas) en las paredes del vaso y dejar secar a 37°C hasta el otro día.**
- f) Disolver el precipitado con 20 ml de PBS agitando por 2 horas a temperatura ambiente. Se considera este producto 100 % de SNH**
- g) Guardarlo en viales (2-3 ml/vial) a -20 °C.**

## **Bibliografía.**

- 1- Acha N. Pedro , Szyfres B. 1989. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. OPS 2a Edición pp. 302-305
- 2- Anderson CR, Downs WG. and Hill D.E. (1956). Isolation of dengue viruses from human being in trinidad. *Science* 124: 224-225
- 3- Anónimo (1989). Dengue en las Américas 1980-1987. *Bull. of Sanit. Panam* 10 (1): 1-8
- 4- Ausburn P.M, and C.F. Craig. (1907). Experimental investigation regarding the aetiology of dengue. *Journal Inf. Dis* 4: 440-475.
- 5- Bancroft T.L. (1906). On the aetiology of dengue fever. *Aust. Med. Gaz* 25: 17-18
- 6- Bhamarapraroti N. (1989). Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev. Inf. Dis 11 (Suplementa)* 826-829.
- 7- Boulton RW and Westaway EG. 1976. Replication of the flavivirus: proteins, glycoproteins, and maturation associated with cell membranes. *Virology* 69: 416-430
- 8- Bray M, Zhao T, Eckels KH. 1989. Mice Immunized with recombinant vaccinia and/or non structural protein NS-1 are protected against fatal dengue viruses encephalitis. *Journal Virology* 63: 2853 - 2856.
- 9- Cantelar N. (1981). Circulación de dengue en Cuba (1978-1979). *Rev. Cub. Med. Trop.* 33: 72-78
- 10- Casals J and Brown LV. (1954). Hemagglutination with arthropod borne viruses. *J. Exp. Med* 99: 429-449

- 11- Center for Diseases Control (1989). Update. Imported dengue U.S.A. in 1987. *MMWR* 38: 463-465
- 12- Centers for Diseases Control.1986. *Aedes albopictus* infestation: United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 35:649-651
- 13- Clarke DH, Casals J. 1958. Techniques for hemagglutination and hemmagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Med. Trop. Hyg* 7: 561-573
- 14- Cleland J.B, Bradley, and McDonal W. (1919). Further experiments in the aetiology of dengue fever. *J. Trop.Med. Hyg* 18: 217-254
- 15- Chungue E, Marche G and Roux J. 1989. Comparison of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbente assay (IgM-ELISA) and heamagglutination inhibition (IH) test for detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgM-ELISA antibodies in Tahiti. *Transaction of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 83: 708- 711
- 16- Dauhaday CC,Brandt WE, McCown JM, Russell PK. 1981. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherente human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun.* 32: 469-743
- 17- De Madrid AT, Porterfiel JS. 1974. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virology*23:91-96
- 18- Ditmar D, Cleary J, Castro A. 1979. Immunoglobulin G and M- specific Enzyme linked immunosorbente assay for detection of dengue antibodies. *Journal of clinical microbiology.* Vol. 9 No. 4: 498-502.

- 19- Ehrenkranz N.J, Ventura AK, Cuadrado R.P. Pand W.L. and Porter J.E. (1971). Pandemic dengue in Caribbean countries and Southern United States, past, presente and potential problems. *New England Journal Med.* 285: 1460-1465
- 20- Encuesta seroepidemiológica realizada por Dirección General de Epidemiología y el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.) 1986
- 21- Gómez D.H. (1991). El dengue en las Américas un problema de salud regional. *Salud Pública Mex* Jul-Agos. 33 (4): 347-355
- 22- Gómez D.H., Koopman J, Chery L, Zárate M.L, Vaca M. and Longini M. (1988). Dengue epidemics of the pacific coast of México. *Int. J. of Epidemiology* 17 (1): 178-186
- 23- Guzman M.G, Kour G, Morier, Soler M, and Fernández A. (1984). Casos Mortales de dengue hemorrágico en Cuba en 1981. *Bol. of Of Sanit. Panam* 97: 111-117
- 24- Halstead S.B. (1980). Dengue hemorrhagic fever- a public health problem and a field for researerc. *Bull of W.H.O.S8* (1): 1-21
- 25- Halstead S.B. (1980). Pathogenesis of dengue: Challenges of molecular biology. *Science* 239: 476-481
- 26- Halstead SB. 1979. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *Journal Infect Diseases.* 140: 527-533
27. Halstead SB. 1984. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI Dengue. *Rev. Intec. Dist.* 251-264
- 28- Halstead SB. 1981. The pathogenesis of dengue: Molecular epidemiology in infection disease. *Am. J. Epidemiol* 5: 636- 648

- 29- Halstead SB, Eckels KH. 1984. Selection attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. *Am. J. Trop. Med. and Hyg* 33: 666 - 689.
- 30- Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. 1960. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of Philipinies and Thailand. *Science* 131: 1102-1103
- 31- Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, and Brand WE. (1982). Dengue virus specific and flavivirus group reactive determinants identified with antibodies by immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med Hyg* 31: 830-836
- 32- Henchal EA, Henchal LS, Thaisomboonsuk BK. 1987. Topological mapping of unliqe epitopes on the dengue -2-virus NS1 protein using monoclonal antibodies *J. Gen. Viral* 68: 845-851
- 33- Henchal EA, McCown JM, Burke DJ, Seguin MC, Brandt WE. 1985. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue 2 virions using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med Hyg* 34:162-167
- 34- Henchal EA, Putnak JR. 1990. The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* Vol.3 No. 4: 376- 396.
- 35- Henchal EA. 1983 Rapid identification of dengue viruses isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescent assay *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 264-270
- 36- Imbert JL, Guevara P, Sotelo J, Ramos C. 1987. Efecto neuroptrópico del virus dengue 2 en cultivo de células del SNC de ratón. *Memorias del VII congreso Nacional de Inmunología*, Zacatecas, Zac: Sociedad Mexicana de Inmunología.
- 37- Innis BL, Nisalak A and Hoke CH. 1989. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to characterize dengue infections where Dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 40: 418-427

- 38- Irie K, Mohan P.M, Sasaguri Y, Putnak R and Padmanabahan R. 1989. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* 74: 197-211
- 39- Kaplan JE, Eliason DA, Moore M. 1983. Epidemiologic investigations of dengue infection in Mexico 1980. *Am. J. Epidemiology* 117: 335-343.
- 40- Khin MN, Than KA. 1983. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 590-594
- 41- Kimura R and Hotta S. (1944). On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igakku* 3379: 629-633
- 42- Kouri G, Guzmán G, Bravo J. (1986). Dengue hemorrágico en Cuba. Crónica de una epidemia. *Bol. Of. Sanit. Pan* Vol. 100 (3): 322-29
- 43- Kumate J., y Gutierrez G. (1990). Manual de Infectología, 11a. Edición. Edit. EDITAR.
- 44- Logroño MA, Farfan- Ale, Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Zavala-Velazquez JE. 1989. Epidemic dengue fever caused by dengue type 4 in Yucatan, México. II Clinical observations on confirmed dengue fever with manifestations haemorrhagic. Report from the Departamento de Patología Tropical, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Merida, Yucatan. U.A.Y y San Juan Laboratories, Center for Infectious Diseases. C.D.C., San Juan, Puerto Rico.
- 45- Manual de Técnicas de laboratorio para el diagnóstico del dengue. San Juan Puerto Rico. C.D.C. Organización Panamericana de la Salud. 1981
- 46- Meiklejohn G.B; England B. and Lemmet S. (1952). Adaptation of dengue virus strains in unweaned mice. *Am. J. Trop. Med. and Hyg* 1: 51-78

- 47- Moore CG, Cline BI, Ruiz T, Lee D, Romney JH, Rivera-Correa E. 1978. Aedes aegypti in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 27:125-131
- 48- Moreau J, Rosen S, Lavoraulet J. 1973. An epidemic of dengue on Tahiti; associated with haemorrhagic manifestations. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 22: 237 - 241
- 49- Organización Mundial de la Salud. Dengue Hemorrágico, Diagnóstico, Tratamiento y lucha. O.M.S. 1987: 1-62.
- 50- Pang T. 1983. Delayed-type hypersensitivity: Probable role in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome. *Rev. Infectious diseases* 5 (2) : 346- 352
- 51- Finheiro P.F. (1989). El dengue en las Américas 1980-1989. *Bol. Epidemiol. C.F.S.* Vol. 10 (1): 1-8
- 52- Ramos Celso. 1989. Biología de la infección causada por el virus del dengue. *Salud Pública* Vol. 31 No. 1: 54 - 72
- 53- Rehill TM. (1989). Classification, distribution and importance of Arbovirus. *Tropical Medical Parasitology* 40: 391-395
- 54- Rice CM, Aerborsold R, Teplow DB . 1986. Partial N-terminal amino acid sequence of three nonstructural proteins of two flavivirus. *Virology* 151: 1-9
- 55- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL and Strauss JH. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733
- 56- Rosen L. (1958). Observations on the epidemiology of dengue in Panama. *Am. Journal of Trop. Med. Hyg* 68: 45-48.

- 57- Rosen L (1974). Dengue type 3 infection in Panama. *Am. Journal of Trop. Med. Hyg.*23: 1205-1206
- 58- Ruseff, PK, Nisalak A. 1967. Dengue virus identification by plaque reduction neutralization test. *J. Immunol*99: 291-296
- 59- Sabin A.B. and Schlesinger R.W. (1945). Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science* 101: 640-642
- 60- Sabin A.B. (1952). Research on dengue during World War II *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*1: 35-50
- 61- Sabin A.B. (1950). The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriology Rev* 14: 225-232
- 62- Schlesinger RW, Gordon JW, Frankel JW, Winter PR, Paterson JL, Darrance WR (1957). Clinical and serologic response of man to immunization with attenuated dengue and yellow fever viruses. *Journal of Immunology*77: 352-364
- 63- Shapiro D, Brandt W.E, and Russell K. 1972 Change involving a viral membrane glycoprotein during morphogenesis of groupo B arbovirus. *Virology* 50: 906-911
- 64- Smithburn KC. 1954. Antigenic relationships among certain arthropod-borne viruses as revealed by neutralization test. *J. Immunol* 72:376-388
- 65- Speight G. and Westaway EG. 1989. Positive identification of NS-48 the last of the hypothetical nonstructural proteins of flavivirus. *Virology* 170: 299-301
- 66- Srisalku KC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med and Hyg* 38 (2): 411- 419

- 67- Stollar V. 1969. Studies on the nature of dengue virus. IV. The structural proteins of type 2 dengue virus. *Virology* 33 : 426-438
- 68- Sukavacha P. Nisalak A. Halstead SB. 1966. Tissue Culture techniques for the study dengue viruses. *Bull. W.H.O.* 35: 65-70.
- 69- Sumarmo H. 1978. Encephalopathy associated with dengue infection. *Lancet* 1:449-455
- 70- Sumarmo S. Wuwr H. Gubler DJ. Suharvono W. Sorensen K. 1981. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull. W.H.O.* 61: 693 - 701
- 71- Sunkip RK, Gelland SJ, Higuchi GT, Vom KB, and Erlich HA. (1988) . Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- 72.- Thomas N.R. and Horstal F.L. (1972). Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades por Virus y Rickettsias, 3a. Edición. Edit. Interamericana.
- 73.- Tren DW. 1977 Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focussing. *J. of Virology* 22: 608-618
- 74- Uribe J.L. (1983). El problema del control del *Aedes aegypti* en América. *Bull. of Sanit. Panam* 94 (5): 473-475.
- 75- Varma MG, Pudnax M. and Leak C.J. 1974. A study of cytopathic effect of arboviruses on cultures from *A. albopictus* Cell line. *Trans R. Soc Trop. Med. Hyg* 68: 373- 382
- 76.- Vigilancia Epidemiológica Internacional. Número especial Dengue hemorrágico. *Bol. Trimestral*/Vol. 4 No. 10. Febrero de 1990 Dirección General de Epidemiología.

77- Wengler G, H.J. Gross. 1976. Studies on virus specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cell infected with flavivirus. *Virology* 89: 423-437.

78.- Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY. (1985) Flaviviridae . *Intervirology* 24: 183-192

79- Westaway PJ, Napurtti sd, Teihny R, Padmanabhan R, (1987) Detection of dengue viruses RNA using Radioimmunoassay. *J.Virology Meth* 15: 187 - 200

80- Dirección General de Epidemiología (1991) Monografía Sobre la Epidemiología del Dengue. S.S.A.