



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS
DE DIAGNÓSTICO DE DENGUE EN EL LABORATORIO DE SALUD
PÚBLICA DEL ESTADO DE TABASCO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
ALONSO OVANDO CHICO

ASESORA: M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
EXÁMENES de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de la eficacia de las pruebas serológicas de diagnóstico de dengue en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Tabasco.

Que presenta el pasante: Alonso Ovando Chico

Con número de cuenta: 408008370 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres, Eddy Guy y Maria Catalina, sin cuyos esfuerzos esta obra jamás hubiera podido ser completada, y a mis hermanos Caty y Eduardo por su invaluable apoyo.

A la maestra Ana Laura Vázquez y al profesor René Damian, así como a todos mis profesores de la licenciatura en QFB de la FESC UNAM, por guiarme en el camino de la búsqueda del conocimiento y animarme a alcanzar la excelencia.

A mi querida Gina, por su paciencia y complicidad en los momentos más angustiosos.

A mis amigos Carlos Alberto, Marco Antonio, Emiliano, Kathia y Oscar, por ayudarme a concentrarme en el trabajo; y a mis amigos Jorge Cosme, Lizbeth, Jesús, Gabriella y Jon por ayudarme a distraerme.

Y finalmente, a mi querido amigo Sergio Storelli, que se pasó más de una tarde discutiendo conmigo los temas que trata esta obra, entre muchos otros.

CARERE DEBET OMNI VITIO QVI IN ALTERVM DICERE PARATVS EST

...И НАШИ ТЕМ НАГРАЖДЕНЫ УСИЛЬЯ,
ЧТО ПОБОРОВ БЕСПРАВИЕ И ТЬМУ,
МЫ ОТКОВАЛИ ПЛАМЕННЫЕ КРЫЛЬЯ
СВОЕЙ
СТРАНЕ
И ВЕКУ СВОЕМУ!

ÍNDICE

i. Índice de tablas.....	1
ii. Índice de figuras.....	1
iii. Abreviaturas.....	2
iv. Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Introducción.....	6
1.2 Vigilancia epidemiológica.....	6
1.3 Antecedentes de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.....	8
1.4 Lineamientos para el diagnóstico de dengue.....	10
1.5 Objetivos.....	11
1.6 Metodología.....	11
2. Dengue.....	14
2.1 Antecedentes de la enfermedad.....	14
2.2 Características del virus.....	15
2.3 Ciclo viral.....	19
2.4 Patogenia.....	21
3. Métodos de diagnóstico.....	26
3.1 Métodos actuales para el diagnóstico de dengue.....	26
3.2 Algoritmo de laboratorio para el diagnóstico de dengue.....	29
3.2.1 Muestras recibidas en el laboratorio entre 0-5 días de haber iniciado la fiebre.....	30
3.2.2 Muestras recibidas en el laboratorio con ≥ 6 días de haber iniciado la fiebre.....	31
3.2.3 Resultados indeterminados.....	31
3.2.4 Determinación de material genético mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real.....	33

4. Resultados.....	34
5. Discusión.....	38
6. Conclusiones y perspectivas.....	41
7. Referencias.....	43

i. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de pruebas serológicas de diagnóstico de dengue.....	37
--	----

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología.....	13
Figura 2. Estructura del DENV.....	16
Figura 3. Genoma del DENV.....	16
Figura 4. Clasificación de casos de dengue.....	22
Figura 5. Inhibición de la hemaglutinación.....	26
Figura 6. Analizador ThunderBolt® de Gold Standard Diagnostics para ELISA.....	28
Figura 7. Prueba rápida de inmunocromatografía Panbio Dengue Duo Cassette.....	28
Figura 8. Sistema Abbott m2000sp™ para RT-PCR Multiplex en tiempo real.....	29
Figura 9. Algoritmo de laboratorio para el diagnóstico de dengue.....	32
Figura 10. Clasificación de dengue.....	34
Figura 11. Resultados de tipificación viral.....	34
Figura 12. Dengue clásico.....	35
Figura 13. Dengue grave.....	35
Figura 14. Dengue por edades.....	35
Figura 15. Dengue por sexos.....	35
Figura 16. Dengue por municipios.....	36

iii. ABREVIATURAS

ApoptoM	secuencia peptídica de la proteína M con propiedades apoptóticas
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BiP	Binding immunoglobulin Protein (proteína de unión a inmunoglobulina)
°C	grados Celsius
C	proteína de la cápside
CD	Cluster of Differentiation (cúmulo de diferenciación)
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
cm	centímetros
DALY	Disability-Adjusted Life Years (años de vida ajustados por discapacidad)
DGAE	Dirección General Adjunta de Epidemiología
DENV	Dengue Virus (virus de dengue)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin (Molécula de adhesión intracelular no asociada a integrina específica de células dendríticas)
DOF	Diario Oficial de la Federación
E	proteína de envoltura
EFE	Enfermedad Febril Exantemática
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
Fc	Fragment crystallizable (Fragmento cristalizable)
FD	fiebre por dengue
FHD	fiebre hemorrágica por dengue
HLA	Human Leukocyte Antigen (antígeno leucocitario humano)
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule (molécula de adhesión intracelular)
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IH	Inhibición de la Hemaglutinación
IL	Interleucina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kb	mil pares de bases
kDa	mil Daltons ($1 \text{ Da} = 1.66053892173 \times 10^{-27} \text{ kg}$)
KDEL	Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutámico-Leucina
L	litros
LAMR	receptor de laminina
LESP	Laboratorio Estatal de Salud Pública
M	proteína de membrana
m⁷GpppAm	7-metilguanósina-5'-trifosfato-metiladenosina
MAC-ELISA	M Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de captura de anticuerpos)
MHC	Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad)
mm	milímetros
mRNA	RNA mensajero
MNA	Microneutralization Assay (prueba de microneutralización)
NK	Natural Killer
nm	nanómetros
NS	Nonstructural protein (proteína no estructural)
NS3hel	dominio helicasa de la proteína NS3
NS3pro	dominio proteasa de la proteína NS3
NTPasa	Trifosfatasa de Nucleótidos estimulada por RNA
pH	potencial de Hidrógeno
prM	proteína precursora de membrana
PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test (prueba de neutralización por reducción de placas)

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase (RNA polimerasa dependiente de RNA)
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
RNasa	ribonucleasa
RNLSP	Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SEED	Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones
S	Svedberg (1 S = 10 ⁻¹³ segundos)
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SS	Secretaría de Salud
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
TDR	Programa Especial para la investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales
T_h	T helper (Linfocitos T cooperadores)
TNF	Tumoral Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)
UI	Unidades Internacionales
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule (molécula de adhesión vascular)

iv. RESUMEN

El dengue, o fiebre por dengue, es una de las principales enfermedades virales transmitidas por artrópodos en el mundo. Cuando la infección resulta en enfermedad aparente, el resultado más común es una enfermedad febril aguda. El agente causal de esta enfermedad es el virus de dengue (DENV), conformado por 4 serotipos (DENV1–4). El dengue, por ser una enfermedad de rápida transmisión, requiere de un sistema de vigilancia epidemiológica proactiva capaz de detectar tempranamente la propagación viral y predecir las epidemias, a fin de orientar las medidas de control con antelación al momento de transmisión máxima. En nuestro país, a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica se realiza la recolección sistemática, continua, oportuna y confiable de información relevante y necesaria sobre las condiciones de salud de la población y sus determinantes. El personal de los laboratorios estatales que conforman la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública está capacitado para que cada Laboratorio Estatal de Salud Pública realice la vigilancia virológica en su estado. La eficacia de este sistema depende de la capacidad de diagnóstico de laboratorio para la detección temprana de la circulación del virus y requiere de técnicas de laboratorio rápidas y confiables. El presente trabajo se propuso evaluar las distintas pruebas serológicas de diagnóstico de dengue contempladas por los lineamientos para el diagnóstico de dengue vigentes en el LESP Tabasco con el fin de determinar su eficacia. Las pruebas serológicas de diagnóstico empleadas en el LESP Tabasco son: la prueba de determinación de antígeno viral (NS1), la prueba de determinación de IgG por ELISA, la prueba de determinación de IgM por ELISA, y la prueba de determinación de material genético viral mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real. Se determinó la eficacia de las pruebas serológicas de diagnóstico de dengue con base en su utilidad para establecer un análisis comparativo de los tipos de enfermedad de dengue y cada uno de los 4 serotipos de DENV. Para realizar la evaluación se analizaron los resultados obtenidos mediante la prueba de determinación del antígeno viral (NS1) por ELISA y se compararon con los resultados obtenidos mediante la prueba de determinación de material genético viral mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real, obtenidos a partir de las muestras recibidas en el transcurso de un año, durante el periodo comprendido entre agosto de 2013 y agosto de 2014. El análisis realizado a partir de las pruebas serológicas de diagnóstico de dengue contempladas dentro de los lineamientos vigentes en el LESP Tabasco demostró que las pruebas evaluadas resultan eficaces y confiables, y le permiten a esta institución estar al mismo nivel de la mayoría de los laboratorios clínicos nacionales e internacionales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

El diagnóstico eficaz del dengue es fundamental para la detección temprana de casos graves, la confirmación de casos sospechosos y el diagnóstico diferencial, además de que permite la vigilancia epidemiológica, el control de brotes, estudios de patogénesis, investigaciones académicas, desarrollo de vacunas y pruebas clínicas.

Las pruebas de laboratorio empleadas en el diagnóstico de dengue abarcan el aislamiento del virus, detección de ácido ribonucleico viral, antígenos o anticuerpos. El método de elección para el diagnóstico depende de la etapa de la enfermedad en que se encuentra el paciente.

El presente trabajo propone evaluar la capacidad del LESP Tabasco para realizar un diagnóstico eficiente y preciso del dengue, así como el alcance de su contribución a la vigilancia epidemiológica de dengue a nivel nacional. Se abarcan una serie de temas relativos a la enfermedad desde los antecedentes del dengue, la epidemiología y los métodos de diagnóstico para concluir la eficacia de estos. Este trabajo de investigación parte de una metodología analítica inductiva, apoyada en consulta de varios artículos de investigación y divulgación.

Se espera que los resultados sirvan para establecer la eficacia las pruebas de diagnóstico empleadas actualmente para realizar un análisis epidemiológico que permita tener un panorama más claro de la incidencia y prevalencia del dengue en la entidad, a fin de proporcionar una herramienta de análisis a las autoridades en materia de salud encargadas de elaborar las estrategias necesarias para combatir la enfermedad a nivel nacional.

1.2 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

La vigilancia epidemiológica es el estudio permanente y dinámico del estado de salud en la población, y tiene como propósito presentar opciones para la toma de decisiones. Desde el punto de vista operativo incluye la recopilación, procesamiento y análisis de los daños y riesgos en salud (InDRE-SS, 2012). El dengue, por ser una enfermedad de rápida transmisión, requiere de un sistema de vigilancia epidemiológica proactiva capaz de detectar tempranamente la propagación viral y predecir las epidemias, a fin de orientar las medidas de control con antelación al momento de transmisión máxima. La eficacia de este sistema depende de la capacidad de diagnóstico de laboratorio en la detección temprana de la circulación del virus y requiere de técnicas de laboratorio rápidas y confiables (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

Se estima que cerca de 3 600 millones de personas viven en zonas tropicales y subtropicales donde existe riesgo de transmisión del virus de dengue (DENV). Los estimados globales varían, pero regularmente se aproximan a entre 50 y 200 millones de infecciones, 500 000 episodios de dengue grave, y más de 20 000 muertes relacionadas con el dengue al año. En el 2012, el dengue fue nuevamente clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como ‘la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo’ debido a la significativa distribución geográfica del virus y su vector hacia áreas previamente no afectadas y la costosa carga de salud, económica y social que trae consigo en las poblaciones de áreas endémicas. El número estimado de pérdida de años de vida ajustados por discapacidad (DALY) varía, pero un estimado de 2009 de DALYs perdidos debido al dengue fue de 700 000 al año. Un estudio que evaluó a todas las naciones de América estimó un costo anual agregado del dengue en el continente americano de \$210 000 millones de dólares. Aproximadamente el 60 % de este costo está relacionado a pérdidas indirectas o “de productividad”, y la cantidad notablemente excluyó costos necesarios de prevención y control del vector. En la mayoría de los países, la principal carga de morbilidad y mortalidad recae en los niños y en la población económicamente activa. Se ha demostrado que la duración reconocida de la endemidad, la lluvia y la densidad poblacional están asociadas con la mortalidad del dengue en América Latina y el Caribe (OMS/TDR, 2009).

Debido a la deficiente vigilancia epidemiológica, bajo nivel de reporte, baja tasa de casos fatales, dificultades para el diagnóstico, y análisis comparativos inconsistentes, es probable que la verdadera incidencia e impacto del dengue sea significativamente mayor a la reportada hasta ahora. A pesar del grado de incertidumbre de los números totales, existe evidencia de que actualmente hay transmisión de dengue en todas las regiones de la OMS y que hay más de 125 países donde el dengue es endémico (Murray et al, 2013).

La reaparición del vector en el territorio nacional y la ocurrencia de casos y brotes importantes de enfermedades en las que éste participa, sobre todo en la región de Centroamérica y el Caribe, así como los flujos migratorios de la población de sur a norte, entre otros, determinaron la reaparición de dengue en México durante 1978; a partir de ese año, paulatinamente se ha convertido en un problema de salud pública en el país y en todo el continente. Actualmente el número de entidades federativas donde se ha demostrado su presencia llega a cubrir más de las tres cuartas partes del territorio nacional, incluso en sitios considerados no viables para su desarrollo. Más aún, la circulación de los cuatro serotipos de DENV en el país ha determinado, al coincidir con otros factores, un incremento en la ocurrencia del padecimiento y la presencia cada vez mayor de cuadros hemorrágicos (Navarrete-Espinosa y Gómez-Dantés, 2006).

En nuestro país, a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) se realiza la recolección sistemática, continua, oportuna y confiable de información relevante y necesaria sobre las condiciones de salud de la población y sus determinantes (NOM-017-

SSA2-2012). Corresponde a la Dirección General Adjunta de Epidemiología (DGAE) coordinar la elaboración de las normas y procedimientos para la vigilancia epidemiológica correspondiente. El SINAVE capta, registra y analiza datos de morbilidad, mortalidad y daños, así como riesgos a la salud, en este caso, específicamente para dengue a través del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), apoyado a su vez en: la Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades, los sistemas especiales de vigilancia epidemiológica, y el Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones (SEED) (InDRE-SS, 2012). El sistema se alimenta de la concentración de los casos registrados en el formato SUIVE-1-2014 que se genera semanalmente en cada unidad de salud.

1.3 ANTECEDENTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA

En 1995 en México se conformó la Red para el Diagnóstico de Dengue, integrada por siete Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP). A partir de ese año el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), instancia del ejecutivo federal que entre otras funciones, desarrolla y promueve acciones de aseguramiento de la calidad, para promover la mejora continua en el desempeño técnico, ha ofrecido a la Red cursos de capacitación, capacitaciones en servicio, supervisiones y asesorías, incluyendo el apoyo con equipos e insumos en caso de emergencias epidemiológicas y desastres. Actualmente apoya a los LESP con el servicio de reactivos e insumos para realizar la determinación de anticuerpos IgM, anticuerpos IgG y para la detección de antígeno viral NS1 comerciales.

Desde 1999 el Laboratorio de Arbovirus inició un programa de control de calidad en el que la Red enviaba al InDRE el 100 % de las muestras positivas y el 10 % de las muestras negativas para dengue. En el 2002 la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) se incorporó al “Programa Caminando a la Excelencia” para evaluar el desempeño de los LESP.

La evaluación del desempeño es una parte importante del sistema de calidad y tiene como objetivo promover la calidad analítica entre los laboratorios, ayudando a identificar errores y estimulando el mejor desempeño de los mismos, respecto a los programas prioritarios de la salud para fomentar su desarrollo.

En el año 2003 se inició la evaluación del desempeño para el diagnóstico serológico de dengue mediante el envío de paneles de eficiencia y se estableció el envío únicamente de muestras probables de Fiebre Hemorrágica por Dengue o Dengue Grave para control de calidad o en su caso muestras con serotipo no identificado en los últimos años en el estado. En julio de 2012 esta evaluación del desempeño se actualizó y mejoró, al implementar paneles algorítmicos que evalúan de manera integral el desempeño de cada LESP con

respecto al algoritmo de diagnóstico vigente y a partir de 2013 fueron incluidos los paneles algorítmicos únicos “SMART-ONLY-DEN”.

Durante abril del 2008 el Laboratorio de Arbovirus implementó un nuevo algoritmo de diagnóstico que incluía la detección de antígeno NS1 (glicoproteína no estructural 1 del DENV) en formato de Prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA); metodología que es aplicable únicamente en muestras obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad y que tiene el objetivo de brindar resultados oportunos y confiables. Los resultados positivos de esta metodología han sido aprovechados para realizar la vigilancia virológica (tipificación del virus) en un porcentaje de muestras mediante la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR) en tiempo real.

En marzo de 2010, el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE capacitó al personal de 28 laboratorios estatales que conformaban la RNLSP para dar a conocer el protocolo “Detección y Serotipificación de Virus Dengue Mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real” validado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, División Dengue CDC-Dengue Branch de San Juan Puerto Rico, con la finalidad de que cada LESP realizara la vigilancia virológica en su estado. El seguimiento a la implementación de esta metodología se realizó mediante la aplicación de una cédula. Durante el 2011 fueron 15 los LESP que iniciaron la etapa de control de calidad para RT-PCR en tiempo real para dengue: Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Veracruz y Yucatán. A partir de 2012 se incorporaron 6 LESP a la Red Nacional de Laboratorios para el Diagnóstico de Dengue (Campeche, Guanajuato, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Zacatecas), contando hasta ahora con 21 LESP.

Actualmente los estados antes mencionados cuentan con la metodología liberada debido a que cumplieron con los parámetros de concordancia requeridos por el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos (promedio de 95 % de concordancia en fase de control de calidad y en paneles de evaluación externa del desempeño). Los LESP de Colima y Nayarit se encuentran en fase de control de calidad con resultados de más del 99.5 % de concordancia, motivo por el cual en los meses siguientes recibirán la notificación de liberación de la metodología. El LESP de Hidalgo comenzó este año la fase de control de calidad, obteniendo un resultado de 100 % de concordancia en el panel “SMART-ONLY-DEN” 2013-01. Así mismo el LESP de Chihuahua ya cuenta con la implementación de la metodología, pero por ser un estado no endémico y no tener muestras positivas al antígeno NS1, la liberación de la misma estuvo basada en la aplicación de un panel para la evaluación externa del desempeño, en el que obtuvo un resultado sobresaliente (90-100 % de concordancia); este mismo lineamiento aplicará para aquellos LESP que estén en la misma situación, como el LESP de Durango, el cual obtuvo 100 % de concordancia en el panel “SMART-ONLY-DEN” 2013-01. En caso de que el porcentaje de concordancia del panel no cumpla con los requerimientos, la metodología no será liberada. Esto último

permitirá que dichos estados tengan habilitados los métodos analíticos y las herramientas para poder utilizarlos ante cualquier contingencia, al presentarse casos positivos de NS1. Todos los LESP que cuentan con la técnica diagnóstica molecular liberada son capaces de realizar la vigilancia intencionada directamente en mosquitos transmisores del virus (vigilancia entomo-virológica). Esta última deberá ser realizada en completa coordinación con el InDRE (Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos y Laboratorio de Entomología) y el Programa de Control de Vectores Nacional y Estatal (InDRE-SS, 2012).

1.4 LINEAMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DENGUE

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector, las técnicas alternativas para confirmar o descartar un caso probable en los primeros días de haber iniciado con la fiebre (0-5 días) son las técnicas virológicas para detectar y tipificar al virus (aislamiento viral en cultivo de células e identificación por inmunofluorescencia directa e indirecta) o las moleculares (RT-PCR en tiempo real o punto final). A finales del año 2006, apareció una alternativa analítica en formato de ELISA más fácil, rápida y oportuna para aplicar en los primeros días de evolución de la enfermedad. Esta técnica se basa en la identificación de la glicoproteína no estructural 1 del DENV (NS1), implicada en los procesos de replicación viral, la cual es secretada por el virus, lo que permite su detección en la muestra de suero en fase aguda de la enfermedad. Esta técnica tiene reportada una sensibilidad entre el 80-100 % (dependiente del serotipo y genotipo responsable de la infección, además de la presencia en altas concentraciones de anticuerpos IgM o IgG) y una especificidad de 100 % y que conjuntamente con las técnicas comerciales ya existentes para determinación de IgM (sensibilidad de 94.7 % y especificidad del 97.2 %) y para determinación de IgG de segundas infecciones o reinfecciones por serotipos distintos (sensibilidad del 94.5 % y especificidad del 97.3 %) serán las pruebas consideradas como básicas en la implementación del nuevo algoritmo. (InDRE-SS, 2012)

Para realizar los tres ensayos inmunoenzimáticos (ELISA IgM, IgG y NS1) se cuenta con un gabinete de bioseguridad tipo II, un lector de ELISA para placas completas con un filtro de 450 nm y otro de referencia entre 600-650 nm, un lavador para placas completas, una incubadora y micropipetas multicanales y sencillas. Las muestras a procesar se manejan en estricta red fría, es decir que no permanecen a temperatura ambiente, se mantienen almacenadas a 4 °C y solo se sacan del refrigerador mientras se realiza cada procedimiento, periodo durante el cual la gradilla se mantiene sobre una cama de hielo. La importancia del manejo de muestras en estrictas condiciones de red fría radica en aumentar las posibilidades del posterior aislamiento viral y detección de material genético, así como evitar la degradación del RNA viral que es altamente termolábil e inestable.

1.5 OBJETIVOS

Objetivo general: Documentar los métodos de diagnóstico empleados para la vigilancia epidemiológica del dengue en el estado de Tabasco, con la finalidad de determinar si se están obteniendo resultados confiables y representativos.

Objetivos específicos:

- Analizar los métodos de diagnóstico de dengue vigente en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Tabasco para determinar la eficacia de las pruebas de diagnóstico empleadas en esta institución.
- Establecer la relación existente entre la variedad de dengue (clásico y grave) que manifiesta el paciente y el serotipo responsable de la infección.
- Determinar si el método de RT-PCR Multiplex en tiempo real está resultando efectivo para la tipificación viral de las muestras.

Así mismo se tratará de dar respuesta a las siguientes preguntas:

- ¿Es posible estudiar la relación existente entre serotipos de DENV y manifestaciones clínicas a partir de los resultados de las pruebas de diagnóstico obtenidas en el LESP Tabasco?
- ¿La metodología de diagnóstico de dengue vigente es adecuada para realizar la vigilancia epidemiológica en México?

1.6 METODOLOGÍA

La propuesta inicial buscaba establecer una comparación entre los resultados de diagnóstico de dengue obtenidos mediante pruebas serológicas y compararlos con los resultados de diagnóstico de dengue obtenidos mediante la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real. Sin embargo, el algoritmo de laboratorio vigente para el diagnóstico de dengue establece el uso de la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real únicamente en un número limitado de muestras que previamente hayan resultado positivas para la prueba ELISA NS1 y que hayan sido seleccionadas para su tipificación. Esta metodología no se emplea con fines diagnósticos y solamente tiene el objetivo de realizar la vigilancia virológica de serotipos circulantes en México, por lo que no es posible establecer una comparación de resultados independientes obtenidos mediante la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real con los resultados obtenidos mediante las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico.

Por este motivo, se propuso determinar la eficacia de las pruebas serológicas de diagnóstico de dengue con base en su utilidad para establecer un análisis comparativo de los tipos de enfermedad de dengue, clasificados de acuerdo a los síntomas del paciente a partir de enfermedad febril aguda y corroborados mediante pruebas serológicas de diagnóstico de

dengue, y cada uno de los 4 serotipos de DENV, determinados mediante la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real.

Para realizar la evaluación de la eficacia de las pruebas de diagnóstico de dengue en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Tabasco se analizaron los resultados obtenidos mediante la prueba de determinación del antígeno viral (NS1) por ELISA y se compararon con los resultados obtenidos mediante la prueba de determinación de material genético viral mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real, obtenidos a partir de las muestras recibidas en el transcurso de un año, durante el periodo comprendido entre agosto de 2013 y agosto de 2014. Los resultados analizados corresponden a las muestras recibidas en el LESP durante este periodo, provenientes de diversas instituciones de salud de todo el estado. Las muestras de suero y plasma fueron obtenidas de pacientes febriles con sospecha de dengue.

El objetivo de la comparación de resultados fue determinar la correlación existente entre los resultados positivos obtenidos mediante ambas pruebas, así como realizar un análisis comparativo de la prevalencia de los distintos serotipos presentes en la entidad a lo largo del año y las manifestaciones clínicas asociadas a cada uno.

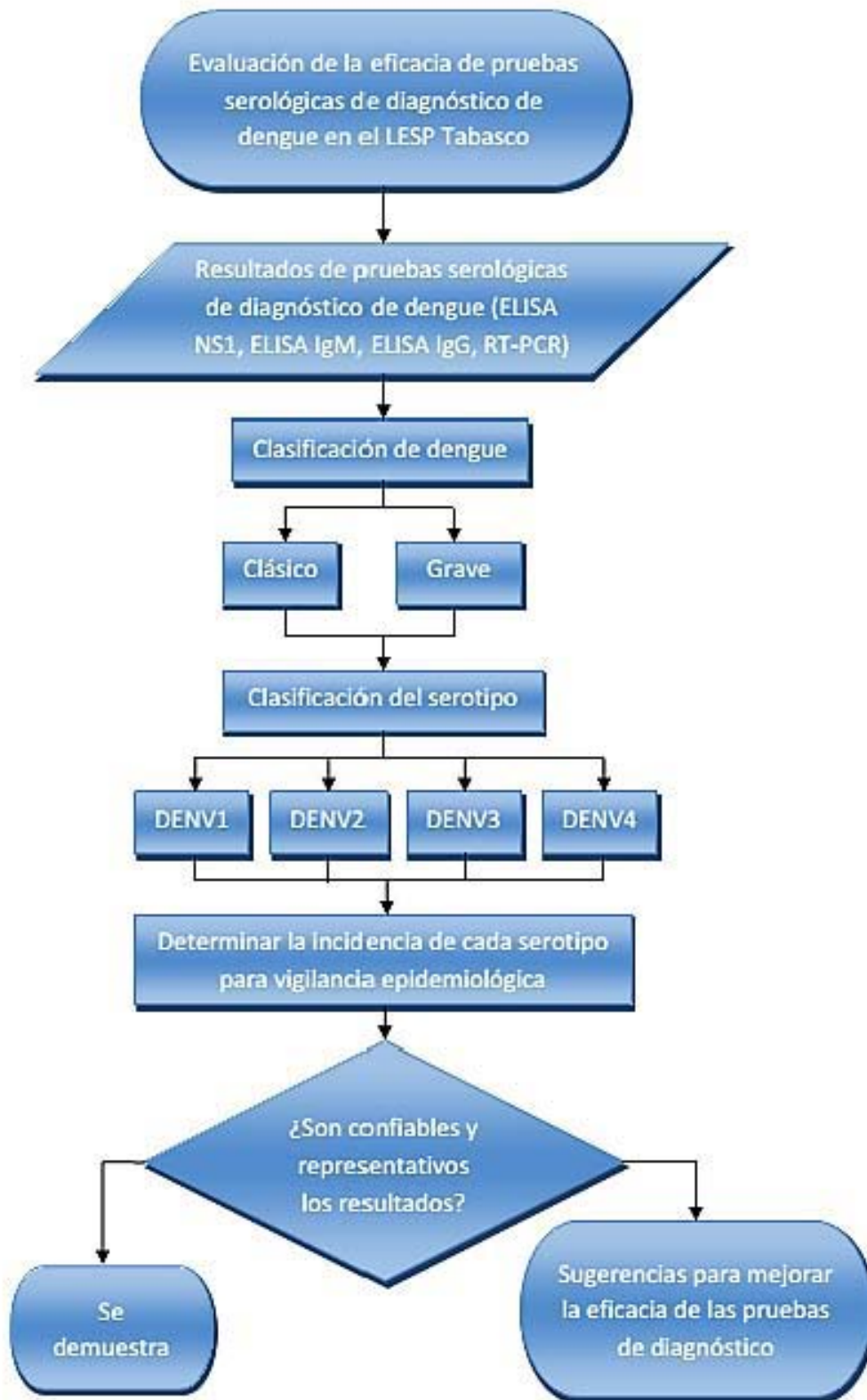


Figura 1. Metodología

2. DENGUE

2.1 ANTECEDENTES

El dengue, o fiebre por dengue, es una de las principales enfermedades virales transmitidas por artrópodos en el mundo. Cuando la infección resulta en enfermedad aparente, el resultado más común es una enfermedad febril aguda similar a la influenza. Sin embargo, en una minoría de casos la enfermedad progresa a hemorragia espontánea, y en casos más severos a síndrome de shock de dengue, caracterizado por fallo circulatorio (Holmes y Twiddy, 2003).

El agente causal de esta enfermedad es el virus de dengue (DENV), un virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con un genoma de aproximadamente 11 kb. El DENV pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Está conformado por 4 grupos antigénicos o serotipos (DENV1–4) con la existencia de varios biotipos (Pizarro, 2009). Los humanos son el principal hospedero del virus y los principales vectores son los mosquitos del género *Aedes*, particularmente *Aedes aegypti*. Otras especies de mosquitos están involucradas en el ciclo de transmisión enzoótico, en el que los mosquitos silvestres transmiten el virus entre primates no humanos de los bosques lluviosos de África y Asia, causándoles infecciones asintomáticas.

No se sabe cuándo apareció el dengue por primera vez en poblaciones humanas, pero se cree que el registro más antiguo de la enfermedad se encuentra en una enciclopedia médica china del año 992, publicada originalmente siglos antes en la dinastía Jin (265-420) antes de ser formalmente editada (Gubler, 1998). Los primeros brotes documentados de fiebre por dengue ocurrieron en 1779-1780 en Asia, África, y América del Norte; la ocurrencia simultánea en tres continentes indica que estos virus y su vector han tenido una distribución mundial en los trópicos. Durante ese tiempo, la fiebre por dengue fue considerada benigna, con intervalos largos (10-40 años) entre los brotes mayores. Una pandemia global de dengue comenzó en el Sudeste de Asia después de la Segunda Guerra Mundial. Hasta la década de 1960, casi todos los brotes de la enfermedad fueron a intervalos de uno o más decenios, posteriormente los intervalos se redujeron.

El primer brote de dengue clásico de las Américas documentado en laboratorios fue con el serotipo DENV3 y afectó a la cuenca del Caribe y a Venezuela en 1963-1964. Anteriormente sólo se había aislado el DENV2 en Trinidad en 1953-1954. En 1968-1969 se aislaron los serotipos DENV2 y DENV3 en otro brote que afectó a varias islas del Caribe.

En la década de 1970, Colombia se vio afectada por brotes de los serotipos DENV2 y DENV3, que se hicieron endémicos en el Caribe. En 1977, se introdujo en las Américas el DENV1, que inicialmente se detectó en Jamaica y se propagó a la mayoría de las islas del Caribe, causando brotes explosivos. Brotes similares se observaron en Sudamérica septentrional, América Central y México. La transmisión autóctona del DENV1 fue

también documentada en el estado de Texas, EUA durante la segunda mitad de 1980. En este período se notificaron cerca de 702 000 casos de dengue. En Cuba el 42 % de sus 10 millones de habitantes se infectaron con el DENV1.

En la década de 1980, la magnitud del problema del dengue en las Américas aumentó considerablemente, caracterizándose por una marcada propagación geográfica de la actividad de esta enfermedad en la región.

El dengue en su forma hemorrágica fue descrito por primera vez en Filipinas en 1953. Dos años más tarde en Bangkok (Tailandia) y en las tres décadas siguientes, en Camboya, China, India, Indonesia, Laos, Malasia, Sri Lanka y Vietnam.

Desde el punto de vista epidemiológico, los países de América Latina se encuentran en la misma situación en que estaban hace dos o tres décadas varios países asiáticos: con brotes repetidos cada 3-5 años y con un progresivo aumento del número de casos de dengue grave, particularmente en países de América Central.

La rápida expansión de grandes centros urbanos, la ausencia de políticas adecuadas de gestión del agua, la propagación del virus por medio de viajes e intercambios internacionales, así como la ineficacia de los programas de lucha antivectorial (cuando éstos existen), se encuentran entre los factores que explican la reemergencia de esta enfermedad en el sudeste asiático, en las islas del Pacífico occidental, en África, en la región oriental del mar Mediterráneo y en América Latina.

El impacto del dengue y del dengue grave con manifestaciones hemorrágicas es enorme y representa una significativa carga económica sobre la comunidad afectada, que se expresa en: pérdida de vidas sin distinción de edad, sexo o estrato social; gastos para la familia por hospitalización del paciente; pérdida del trabajo; gastos considerables para los municipios en programas para controlar al mosquito; interrupción de los servicios de atención de salud; impacto en la economía en términos de pérdida del turismo (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

2.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El DENV es un virus icosaédrico de aproximadamente 50 nm, conformado por una membrana lipídica sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. El virus tiene un coeficiente de sedimentación de 42S y un peso molecular de 4.2 kDa. El RNA genómico funciona como RNA mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante la replicación. Presenta una caperuza tipo I, con una estructura m⁷GpppAm cubriendo el extremo 5' terminal, seguido por una secuencia dinucleotídica conservada AG. El extremo 3' terminal carece de cola poliadenilada y termina con una secuencia dinucleotídica conservada CU (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

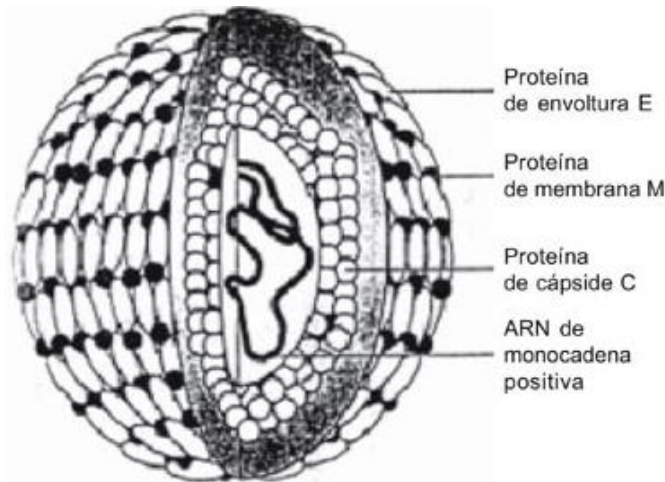


Figura 2. Estructura del DENV. Fuente: Acosta-Baz y Gómez-Cordero, 2005

El interior del virus contiene el complejo riboprotéico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral que consiste de una molécula de RNA de cadena sencilla, polaridad positiva que codifica para un polipéptido único (5' C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 3') que contiene tanto las proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside, la proteína M, asociada a membrana, y la proteína E de la envoltura, que serán parte de la partícula viral; como las proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación del RNA.

El genoma contiene un único marco abierto de lectura (ORF) de más de 10 000 bases, flanqueado por las regiones no codificantes en ambos extremos, que codifica para un precursor polipeptídico, que por sucesivos cortes proteolíticos, genera la formación de las 10 proteínas virales a través de un procesamiento co y postraducciona (Acosta-Baz y Gómez-Cordero, 2005).

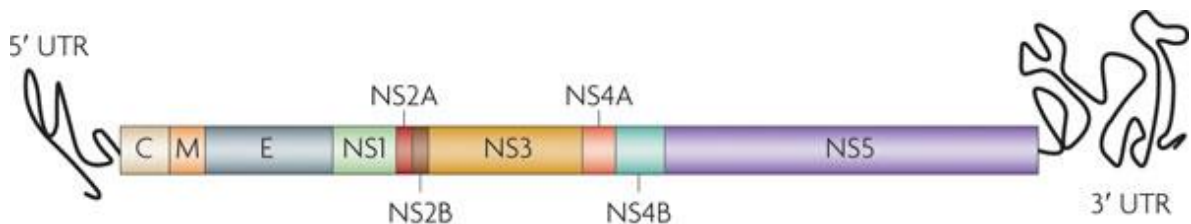


Figura 3. Genoma del DENV. Fuente: Guzman et al., 2010

El virión maduro contiene 3 proteínas estructurales: **C**, proteína de la nucleocápside o núcleo; **M**, proteína asociada a la membrana y **E**, proteína de la envoltura. Los virus inmaduros contienen una proteína conocida por **prM**, que es un precursor de **M** (Acosta-Baz y Gómez-Cordero, 2005).

La proteína C (de la cápside), también conocida como proteína core o de cubierta, pesa aproximadamente 11 kDa. Su estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 anclan la proteína a la membrana del retículo endoplásmico. La hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera se forma el complejo riboprotéico o nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de RNA viral. La hélice 2 posee una naturaleza muy hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. En el primer caso, actúa como una bisagra que favorece el acercamiento del RNA viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del retículo endoplásmico. También recluta gotas lipídicas presentes en el citoplasma que promueven la formación de la partícula viral. Además, la proteína de la cápside anclada en el retículo endoplásmico interactúa con las proteínas precursora de Membrana (prM) y de envoltura E, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales.

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa y está presente en los viriones inmaduros y junto con la proteína M, participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína precursora de membrana es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina, que la divide en dos y genera el péptido pr y la proteína M, de 8 kDa. La proteína tiene dos dominios transmembranales y un ectodominio de 40 aminoácidos, aproximadamente. Este último contiene al péptido ApoptoM, capaz de inducir una señal pro-apoptótica cuando este dominio es transportado por la ruta excretoria de la célula y se puede inhibir cuando el ectodominio se ancla al retículo endoplásmico o cuando se le adiciona el péptido señalizador KDEL, que marca a las proteínas para ser devueltas al retículo endoplásmico.

La proteína de envoltura E tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios denominados I, II y III, y se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Los dominios II y III de cada una de las proteínas del homodímero son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables. La glicoproteína E es el principal inmunógeno del virus. Es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus, por lo que cualquier mutación y modificación postraducciona puede afectar la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DENV, así como regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmunitario.

La proteína NS1 (46 kDa) forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas (*rafts*) de la membrana plasmática. También, se encuentra soluble en el citoplasma y en el espacio

extracelular; por lo que puede estimular al sistema inmunitario. Se ha demostrado que las inmunoglobulinas contra la proteína NS1 pueden estimular la lisis mediada por el complemento y dependiente de anticuerpos, tanto en células infectadas como no infectadas, lo que podría explicar parte del daño al endotelio que conduce al sangrado y a la extravasación plasmática presente en pacientes con diagnóstico de dengue grave (Velandia y Castellanos, 2011). La glicoproteína NS1 del DENV está implicada en los procesos de replicación viral, lo que permite su detección en la muestra de suero en fase aguda de la enfermedad (InDRE-SS, 2012).

La NS2A es una proteína de 22 kDa aproximadamente, que promueve el ensamblaje y la replicación viral. Coordina el uso del RNA genómico producido en cada ciclo de replicación como plantilla para un nuevo ciclo o para ensamblaje viral.

La proteína NS2B (14 kDa) posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico el complejo NS2B/NS3 y luego, por un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2B interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta.

La proteína NS3 (70 kDa) es una proteína bipartita que posee en el extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) y en el extremo C-terminal posee un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y como helicasa del RNA (NS3hel); ambas funciones son indispensables en la replicación viral. El dominio NS3pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 del polipéptido. La función del dominio NS3pro depende de su asociación con la proteína NS2B, que le confiere estabilidad durante su actividad proteolítica mientras que la función helicasa permanece inhibida. La proteína NS3 también está encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico para el inicio del ensamblaje, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos (sintetasas de ácidos grasos). La otra función de la proteína NS3 es actuar como helicasa (NS3hel), desenrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del RNA viral, para favorecer la unión de la polimerasa NS5 sobre el RNA y dar inicio a la replicación.

Las proteínas NS4A y NS4B son proteínas transmembranales altamente hidrofóbicas responsables de inducir y regular las alteraciones en la membrana del retículo endoplásmico necesarias para la formación del complejo de replicación viral unido a membrana.

La proteína NS5 es la más conservada entre todos los flavivirus. Esta proteína es multifuncional, ya que el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del *capping* y la metilación del extremo 5' del RNA genómico; mientras que en el extremo C-terminal se ubica el dominio de RNA

polimerasa dependiente de RNA (RdRp), por lo que actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción viral (Velandia y Castellanos, 2011).

2.3 CICLO VIRAL

La entrada del virus en células mamíferas y en las de mosquito se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula; luego, la proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus. El dominio III de la proteína E interactúa con el receptor para laminina LAMR1, la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*, CD209) y con proteoglicanos como el heparán sulfato.

El receptor para laminina LAMR1 interactúa específicamente con la proteína E de los serotipos 1, 2 y 3 del DENV, lo cual sugiere que esta proteína es un posible receptor viral. Dependiendo del tipo celular, los diferentes serotipos virales pueden utilizar diferentes moléculas receptoras.

Para favorecer la entrada del virus a las células, participan los glicosaminoglicanos o proteoglicanos presentes en la matriz extracelular o que están asociados a las proteínas de superficie de las células. Los proteoglicanos como el heparán sulfato, por su alta carga negativa, pueden actuar como un receptor primario para favorecer el acercamiento de las partículas virales a la superficie celular y, una vez establecido este acercamiento, facilitarían la interacción de la proteína E con proteínas de la superficie para favorecer la endocitosis del virus.

La participación de un correceptor para la infección por DENV, podría explicar por qué este virus puede infectar diferentes tipos celulares, pues este mecanismo le permitiría al virus interactuar inicialmente con el heparán sulfato presente en casi todos los tipos celulares y luego asociarse con un receptor, que promueva la endocitosis.

Este último evento depende de las clatrininas. Luego, la vesícula endocítica se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación del dominio II de la proteína E, que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma.

Cuando la nucleocápside se halla libre en el citoplasma, se inician los procesos de traducción y replicación del RNA. El RNA genómico viral del DENV es monocatenario de sentido positivo, con un único marco de lectura que traduce un polipéptido completo, el cual es procesado en el retículo endoplásmico por proteasas celulares y la actividad

NS3pro, que libera de forma ordenada a las tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral. La replicación del RNA viral es un proceso que no está totalmente entendido; sin embargo, *in vitro* se han detectado tres especies de RNA, denominadas RNA de 20S, 20/28S y 40S, según el valor del coeficiente de sedimentación.

Los RNA de 20S conocidos como formas de replicación, no son degradados por las RNasas y están constituidos por dos cadenas de RNA cada una con polaridad contraria (negativa y positiva). La existencia de las formas de replicación sugiere que estas formas incluyen los intermediarios negativos que actúan como plantilla para la generación de los RNA de sentido positivo. El otro tipo de RNA, los RNA heterogéneos de 20 a 28S, son denominados intermediarios de replicación y corresponden a hebras de RNA de sentido positivo en proceso de elongación. Por último, los RNA de 40S pueden ser degradados por RNasas y, al parecer, es el RNA genómico encontrado en los virus ensamblados; por lo tanto, estos RNA pueden ser utilizados para la traducción proteica o para conformar junto con proteína C la ribonucleoproteína, los nuevos viriones.

Durante la traducción, el polipéptido recién sintetizado es acompañado por las proteínas chaperonas BiP, calnexina y calreticulina; luego, cada una de las proteínas virales se organiza en la membrana del retículo endoplásmico y es procesada por proteasas como la furina, la signalasa o la NS3pro, para finalmente ser modificadas después de la transducción (plegamiento y glicosilación).

Los mecanismos que promueven, regulan y coordinan el ensamblaje del virus, no son conocidos completamente. Sin embargo, por microscopía electrónica y criomicroscopía, se ha sugerido que el proceso de ensamblaje de las partículas del DENV sucede en distensiones del retículo endoplásmico denominadas membranas “convolutas” (*convolute*), donde ocurre de forma simultánea la traducción de la proteína y el ensamblaje del virus.

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del RNA genómico y la proteína C en presencia de pequeñas gotas de lípidos; sobre esta primera estructura luego se asocian las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del retículo endoplásmico. Posteriormente, suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda; este recubrimiento le confiere un aspecto rugoso a la superficie del virus cuando se observa por microscopía electrónica. En el segundo paso, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones cis y trans del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. En esta última etapa, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de la misma, lo que le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína

prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrimeros de E y mantiene unido al péptido pr. Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula sensible e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (Velandia y Castellanos, 2011).

2.4 PATOGENIA

La morbilidad y mortalidad causadas por la infección por DENV están dadas por la complejidad de eventos que se presentan en el transcurso de la infección. Algunos pacientes desarrollan cuadros febriles y dolores generalizados que se resuelven rápidamente sin dejar secuelas. A este tipo de manifestación clínica se le conoce como dengue (fiebre por dengue). Otros pacientes, por el contrario, presentan dolores intensos, fiebre alta e incrementos en la permeabilidad vascular, lo que conlleva a la pérdida de plasma y hemorragias pleurales y gastrointestinales, entre otros.

Estos signos son agrupados en dos entidades clínicas conocidas como dengue con signos de alarma y dengue grave con manifestaciones hemorrágicas o sin ellas, antes llamado dengue hemorrágico, o fiebre hemorrágica por dengue. Anteriormente las infecciones sintomáticas por el DENV se agrupaban en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Además, esta última se clasificaba en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV correspondían al síndrome de choque por dengue. Las dificultades en la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplían con los estrictos criterios para ese diagnóstico, llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación. Actualmente, la clasificación de fiebre por dengue/fiebre hemorrágica por dengue/síndrome de choque por dengue continúa utilizándose ampliamente.

Un estudio multicéntrico clínico prospectivo apoyado por OMS/TDR en las regiones con dengue endémico confirmó que se puede observar una diferencia bien definida entre el dengue grave y el no grave. Sin embargo, por razones prácticas fue conveniente dividir el gran grupo de pacientes con dengue no grave en dos subgrupos: dengue con signos de alarma y dengue sin signos de alarma. Debe tenerse en cuenta que los pacientes con dengue sin signos de alarma pueden desarrollar dengue grave (OMS/TDR, 2009).



Figura 4. Clasificación de casos de dengue. Adaptado de OMS/TDR, 2009

El periodo de incubación del virus desde su inoculación hasta la aparición de síntomas es de 3 a 14 días, con un promedio de 7 días. Las principales células blanco de la infección por DENV son los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Adicionalmente, se ha reportado que se infectan *in vitro* células del endotelio, varias líneas celulares hepáticas, fibroblásticas y neuronales. Una vez establecida la infección en el hospedero, las células expresan como primera línea de defensa el interferón (IFN) de tipo I (α y β), que busca inhibir la replicación viral. Por otro lado, se inicia el proceso de presentación de antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II, lo que conlleva a que células como las NK (*natural killer*) ataquen a las células infectadas y liberen, junto a los linfocitos T, el IFN de tipo II (γ). Esta actividad es el fenómeno responsable del control de la infección, ya que se establece un estado antiviral mediado por IFN que evita la replicación del virus en las células infectadas o la infección de nuevas células. Además, esta señalización puede inducir la apoptosis de las células infectadas o alteradas.

Por otro lado, los linfocitos T desempeñan un papel preponderante en el establecimiento y control de la respuesta inmunitaria frente al virus. Tanto los linfocitos CD4⁺ como los CD8⁺ estimulados por diferentes citocinas, como el IFN (tipo I y II) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), se activan y secretan citocinas que pueden tener un carácter proinflamatorio o antiinflamatorio.

Esta respuesta inmunitaria es la que normalmente se presenta en los pacientes infectados por primera vez que logran resolver la infección; sin embargo, en los pacientes que sufren una nueva infección con un serotipo diferente al que causó la primera (frecuente en zonas endémicas donde circula más de un serotipo de DENV), ocurre un fenómeno que estimula y exagera la respuesta inmunitaria del paciente, lo que aumenta las probabilidades de que desarrolle dengue grave, con manifestaciones hemorrágicas o sin ellas.

El desarrollo del dengue grave y su asociación con las reinfecciones está bien argumentado clínica y experimentalmente. Una de las teorías más aceptadas y polémicas se denomina potenciación de la infección dependiente o mediada por anticuerpos, que se presenta cuando los anticuerpos producidos y dirigidos contra el serotipo de DENV que causó la infección por primera vez reconocen y forman complejos con el segundo serotipo de DENV causante de la reinfección. Estos complejos antígeno-anticuerpo se unen a los monocitos y macrófagos mediante los receptores Fc, favoreciendo la penetración del virus. Este mecanismo incrementa la proporción de células infectadas, la viremia y la capacidad de dispersión del virus en el organismo. Esto explica por qué algunos pacientes con dengue grave poseen títulos virales más altos en comparación con los pacientes con dengue sin signos de alarma. Además, el fenómeno de la potenciación de la infección dependiente o mediada por anticuerpos estimula la activación en células como linfocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas y otros factores solubles que alteran, entre otros aspectos, la fisiología del tejido endotelial, lo que facilita la extravasación y la formación de edemas, petequias y hemorragias.

La evidencia clínica de la potenciación de la infección dependiente o mediada por anticuerpos está dada por los cientos de casos de dengue grave con manifestaciones hemorrágicas que se han descrito en Tailandia, donde el dengue es hiperendémico y la población más vulnerable a la infección son los menores de 15 años quienes han sufrido por lo menos una infección por DENV. Por otra parte, los menores de un año que presentan signos de dengue grave al ser infectados por primera vez por un serotipo de DENV, desarrollan estos signos por la presencia de anticuerpos anti-DENV transmitidos verticalmente por sus madres. Sin embargo, la literatura también reporta casos de dengue grave con manifestaciones hemorrágicas en pacientes infectados por primera vez. Esto sugiere que el desarrollo de estas manifestaciones puede tener otras causas adicionales, como la edad de los pacientes, el sexo y factores genéticos del individuo, como la raza y algunos polimorfismos asociados a los genes HLA, TNF α , y CD209. Por otra parte, el serotipo y el genotipo del virus también están relacionados con la gravedad de la enfermedad.

Otro mecanismo que se ha asociado al desarrollo de dengue grave es la lisis de las células endoteliales mediada por complemento y dependiente de anticuerpos, especialmente aquellos dirigidos contra NS1, que reconocen un antígeno aún no identificado presente en

la superficie del endotelio. Esta interacción activa el sistema de complemento que altera la permeabilidad vascular e induce la disfunción del tejido y lisis de las células endoteliales.

Por otro lado, la gravedad de la enfermedad puede deberse a las grandes concentraciones y a la constante permanencia de algunas de las citocinas producidas y liberadas por linfocitos, macrófagos y células endoteliales, entre otras. Las células infectadas y las no infectadas responden al estímulo inducido por IFN de tipo I y II que activan sobre éstas la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Además, pueden estimular la expresión de algunas moléculas de adhesión y de receptores que promueven de nuevo la expresión de citocinas y otros mediadores solubles.

Esta activación inmunitaria constante sostiene una señalización que afecta a las células, alterando la función del endotelio, de los linfocitos y de los macrófagos. Entre los mediadores solubles que se han detectado en pacientes infectados con DENV se encuentran citocinas de tipo T_h1 y T_h2 secretadas por linfocitos $CD4^+$ o $CD8^+$. En pacientes con diagnóstico de dengue sin signos de alarma se detectan citocinas de tipo T_h1 como $IFN\gamma$ e interleucina 2 (IL-2), mientras que, en los pacientes con dengue grave se detectan citocinas de tipo T_h2 , como las IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10. Particularmente, la IL-8 se presenta en grandes concentraciones en el suero de estos pacientes y en algunos casos este incremento se asocia con un aumento en la permeabilidad vascular, la efusión pleural y la muerte de los pacientes.

El otro grupo de moléculas que se expresa en exceso en las células infectadas y no infectadas es el de las moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E, L y P-selectina, entre otras. Estas moléculas facilitan el reconocimiento, la unión y la posterior diapédesis de células como los monocitos, que atraviesan la barrera endotelial y circulan en los espacios intersticiales. Esto permite la propagación del virus a otras células y tejidos, y el paso de líquido y mediadores solubles que estimulan los procesos inflamatorios.

Durante la infección por DENV la respuesta inmunitaria puede resolver la infección sin causar grandes traumatismos en el individuo o llevar al organismo a un estado donde la constante estimulación conduce a la activación celular, el aumento de la expresión de mediadores y de receptores que inducen en algunos casos daños tisulares irreversibles, lo que aumenta la gravedad de la enfermedad.

Finalmente, aunque en los últimos años se han definido e identificado varios factores que pueden favorecer directa o indirectamente el desarrollo de las formas más graves de dengue, no se han establecido con claridad las principales causas que incrementan de forma notoria la respuesta inmunitaria en algunos pacientes. Además, el aumento de casos de dengue con manifestaciones atípicas, como miocarditis, encefalitis, hepatitis o insuficiencia renal, sugiere cambios en el perfil de la enfermedad que podrían deberse a cambios del tropismo del virus; esto último muestra la necesidad de conocer más sobre el virus y los

posibles mecanismos que está utilizando para infectar diferentes tipos celulares o diferentes tejidos.

En los últimos años, a partir del conocimiento de la estructura del virus, se ha propuesto, por ejemplo, el bloqueo de la actividad NS3pro con inhibidores específicos, el bloqueo de la polimerasa NS5 con nucleótidos modificados y, más recientemente, se está usando la detección de la proteína NS1 en el suero como una prueba diagnóstica de mayor sensibilidad (Velandia y Castellanos, 2011).

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

3.1 MÉTODOS ACTUALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE DENGUE

El diagnóstico por laboratorio de la infección por el DENV está basado en pruebas de determinación de anticuerpos y en la detección directa del virus. El diagnóstico serológico se realiza con base en la presencia de anticuerpos IgM o aumento en el título de anticuerpos totales o IgG en sueros tomados en las fases aguda y convaleciente de la enfermedad. Los métodos directos comprenden el aislamiento viral, detección del genoma o de los antígenos del virus. Entre los sistemas de aislamiento disponibles están la inoculación de mosquitos y los cultivos celulares.

La respuesta de anticuerpos en la infección aguda por dengue puede ser primaria o secundaria. Los flavivirus comparten grupos antigénicos que pueden dar reacción cruzada en las pruebas serológicas haciendo más difícil el diagnóstico. Las personas que nunca han estado infectadas por un flavivirus o inmunizadas con vacunas para flavivirus (p.ej. fiebre amarilla) desarrollan una respuesta primaria en la cual los anticuerpos son principalmente tipo IgM, mientras que aquellas que han estado en contacto o han sufrido previamente una infección por flavivirus desarrollan una respuesta secundaria con predominio de anticuerpos IgG. Existen diferentes pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos, tales como: Inhibición de la hemaglutinación (IH), Prueba de neutralización (NT), ELISA de captura IgM (MAC-ELISA) y ELISA IgG.

La prueba de Inhibición de la hemaglutinación (IH) es la prueba estándar recomendada por la OMS para la clasificación de la respuesta serológica en las infecciones por dengue. Se basa en el principio de que el DENV, bajo condiciones controladas de pH y temperatura puede aglutinar glóbulos rojos de ganso, y este efecto puede ser inhibido por anticuerpos específicos contra el virus. Esta prueba se utiliza para cuantificar anticuerpos totales y requiere dos muestras de suero pareadas: una en fase aguda y otra en fase convaleciente con intervalo no inferior a siete días; el título se expresa como la mayor dilución del suero que produce IH. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación usualmente aparecen a niveles detectables a partir del día 5 o 6 de la enfermedad en las infecciones primarias, pero se elevan más tempranamente en las infecciones secundarias. Altos niveles IH persisten durante 2-3 meses pero los títulos generalmente empiezan a descender a los 30-40 días y caen por debajo de 1/1280 en la mayoría de los pacientes y permanecen por largos períodos.



Figura 5. Inhibición de la hemaglutinación. Fuente: UNAD, 2010

Esta prueba permite diferenciar infecciones primarias de infecciones secundarias ya que durante las infecciones secundarias los títulos en suero convaleciente suelen ser $\geq 1/2560$. Un título $\leq 1/1280$ sin alza en los títulos de anticuerpos se considera un resultado negativo. Un título $\geq 1/1280$ en muestra única es considerado un diagnóstico presuntivo de infección reciente (menos de tres meses) por el DENV. La IH es una prueba confiable que requiere equipo mínimo, sin embargo, es laboriosa, requiere mucho tiempo y su principal desventaja es la reacción cruzada con otros flavivirus, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

La prueba de neutralización (NT) es el método serológico más específico y sensible para la detección del DENV. El protocolo más utilizado es la técnica de neutralización por reducción de placas (PRNT) y debido a su elevada especificidad y a que los anticuerpos neutralizantes persisten por 48 o más años, es muy útil en estudios seroepidemiológicos. Debido al tiempo requerido para su ejecución (al menos una semana) y dificultad técnica, no se utiliza de rutina.

Las técnicas de IH y NT requieren la obtención de muestras pareadas (aguda y convaleciente), son muy laboriosas y demoran el diagnóstico, por lo cual se han venido desarrollando pruebas tipo ELISA, más simples y rápidas, que permiten distinguir el tipo de anticuerpo (IgG o IgM) y clasificar la respuesta serológica con base en la relación IgM/IgG en muestras únicas pero no permiten determinar el serotipo infectante.

El ELISA de captura IgM (MAC-ELISA) es la prueba más ampliamente utilizada para el diagnóstico serológico de la infección aguda por el DENV. Se han detectado anticuerpos IgM en el día 5 de inicio de los síntomas, en el 80 % de los pacientes y a partir del día 6 en el 90 %; por lo tanto se recomienda que la muestra sea tomada a partir del día 5 cuando la posibilidad de encontrar anticuerpos detectables es alta. MAC-ELISA es un método rápido, sencillo y económico, por lo que es el sistema de elección para los laboratorios que realizan diagnóstico y vigilancia epidemiológica; esta prueba permite la captura de los anticuerpos IgM, del suero del paciente, utilizando inmunoglobulinas anti-IgM humanas, que están previamente unidas a una fase sólida, disminuyendo así la reacción cruzada causada por anticuerpos extraños y mejorando la especificidad. Un resultado positivo en muestra única se considera evidencia presuntiva de infección por el DENV, ya que los anticuerpos persisten 2-3 meses. Un resultado negativo no descarta la infección, ya que es posible que el paciente aun no haya desarrollado anticuerpos, por lo cual se recomienda tomar una segunda muestra con intervalo de 8 días.

Los anticuerpos IgG aparecen a partir del día 5 de inicio de síntomas de las infecciones primarias, aumentan gradualmente y permanecen detectables durante muchos años. En infecciones secundarias los anticuerpos IgG están por lo general presentes en la fase aguda y los títulos aumentan rápidamente en pocos días. Debido a la posible existencia de IgG de memoria, se requiere obtener sueros pareados para evidenciar el aumento en el título de

anticuerpos. Al igual que la IH, el ELISA IgG presenta reacción cruzada con otros flavivirus. Presenta una baja correlación con la IH en sueros pareados correspondientes a pacientes con infecciones primarias (debido a la influencia de anticuerpos IgM en la IH) y una alta correlación en infecciones secundarias, por lo que es posible que en un futuro ELISA IgG pueda reemplazar la IH, debido a que es un método sencillo, fácil de realizar y requiere menor tiempo para su procesamiento.



Figura 6. Analizador ThunderBolt® de Gold Standard Diagnostics para ELISA

El desarrollo de pruebas rápidas tales como la inmunocromatografía, permite detectar simultáneamente anticuerpos IgM e IgG con resultados en pocos minutos, permitiendo la diferenciación entre infección primara y secundaria. Mediante el uso de ésta prueba se ha reportado una positividad del 80 % en muestras tomadas 4 días después del inicio de los síntomas, y superior al 90 % en muestras tomadas en el día 5; sin embargo, también pueden presentar reacción cruzada con otros flavivirus (Ospina, 2004).



Figura 7. Prueba rápida de inmunocromatografía Panbio Dengue Duo Cassette

Una alternativa al diagnóstico serológico de dengue es la detección del RNA viral por medio de la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR) en tiempo real. La viremia es detectable desde aproximadamente 2 días antes de la presencia de fiebre, hasta 5 días después, por lo que esta técnica de detección molecular resulta ventajosa durante la fase aguda de la enfermedad. Esta técnica es conceptualmente simple, altamente específica, y capaz de ser completamente automatizada (Elnifro et al., 2000).

En los laboratorios de diagnóstico el uso de la Prueba de RT-PCR es limitado por el costo y la disponibilidad de una cantidad adecuada de muestras. Para superar estas limitantes se ha descrito un nuevo método de RT-PCR llamado Multiplex. La Prueba de RT-PCR Multiplex permite amplificar más de un par de primers en una misma reacción. Mediante esta técnica es posible analizar la muestra en busca de los 4 serotipos de DENV simultáneamente, lo que permite tipificar las muestras de manera rápida y efectiva.



Figura 8. Sistema Abbott m2000sp™ para RT-PCR Multiplex en tiempo real

Recientemente, el diagnóstico del DENV mediante la detección de la proteína NS1 ha emergido como una alternativa potencial a las técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico de una infección activa. La proteína NS1 es una glicoproteína no estructural esencial para la viabilidad viral y es detectable desde las primeras 24 horas y hasta 9 días después de la presencia de síntomas. De acuerdo a la patogenia viral, la aparición de la NS1 en plasma coincide con la viremia, previa a la seroconversión de IgM, lo que hace del antígeno NS1 un biomarcador ideal para la detección de una infección aguda (Anderson et al., 2014).

3.2 ALGORITMO DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE DENGUE

El algoritmo vigente involucra tres técnicas serológicas básicas: NS1, IgM e IgG. La determinación de antígeno NS1 aplica únicamente en fase aguda de la enfermedad; las determinaciones de anticuerpos IgM e IgG son aplicadas en la fase aguda y convaleciente. La vigilancia virológica deberá ser aplicada en al menos 10 % de las muestras FD NS1+ y en el 100 % de las FHD NS1+ (InDRE-SS, 2012).

3.2.1 Muestras recibidas en el laboratorio entre 0-5 días de haber iniciado la fiebre

Se realiza la prueba de determinación del antígeno viral (NS1) por ELISA (Panbio No. catálogo E-DEN01P). Un resultado positivo confirma el caso. El laboratorio reporta este resultado y da por terminado el algoritmo, no se realiza ninguna otra prueba. El 10 % de los resultados positivos es seleccionado para vigilancia virológica y se manda al departamento de biología molecular para realizar la tipificación del virus por RT-PCR. En caso de un resultado negativo el laboratorio reporta este resultado y se realiza la siguiente prueba indicada en el algoritmo: ELISA para IgG (cuando la muestra tenga 0-3 días de iniciada la fiebre) o ELISA para IgM (cuando la muestra tenga 4-5 días de iniciada la fiebre).

Se realiza la prueba de determinación de IgM por ELISA (Panbio No. catálogo E-DEN01M), únicamente para las muestras que tengan 4-5 días de haber iniciado la fiebre. Un resultado positivo confirma el caso. El laboratorio reporta este resultado y da por terminado el algoritmo, no se realiza ninguna otra prueba. En caso de un resultado negativo el laboratorio reporta este resultado y realiza la prueba de determinación de IgG.

Se realiza la prueba de determinación de IgG por ELISA (Panbio No. catálogo E-DEN02G), únicamente para muestras que estén entre 0-3 días, infección reciente (infecciones secundarias). Un resultado positivo confirma el caso. Este resultado precisa que bajo el diseño de la prueba, permite identificar concentraciones muy altas del marcador a analizar, que representan infección reciente y activa como sinónimo de una reinfección por dengue pero por un serotipo diferente al de la primera infección. El laboratorio reporta este resultado y da por terminado el algoritmo, no se realiza ninguna otra prueba. En caso de un resultado negativo el laboratorio reporta este resultado, asegurando que todas las pruebas antes mencionadas fueron realizadas y tuvieron un resultado negativo, y se da por terminado el algoritmo.

Una muestra negativa a las tres pruebas previas (NS1, IgM, IgG) se considera negativa a dengue y se deberá realizar diagnóstico diferencial para otras arbovirosis, las muestras serán enviadas al InDRE con base en el diagnóstico clínico y previa solicitud de vigilancia epidemiológica estatal (para casos graves y defunciones), ya sea para identificación de flavivirus no dengue o alfavirus como: Virus del Oeste del Nilo, Encefalitis de San Luis, Fiebre Amarilla, Encefalitis Equina del Oeste, Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina Venezolana y Virus Chikungunya; además de Enfermedad Febril Exantemática, Leptospira, Rickettsias o Hantavirus (en caso de signos hemorrágicos).

Ante casos de fiebre icterohemorrágica se sugiere realizar un diagnóstico diferencial con Fiebre Amarilla a personas que viajaron a zonas endémicas. En zonas endémicas para Leptospira se sugiere realizar la prueba rápida al mismo tiempo que se inicie el algoritmo de dengue.

Una vez que se cuente con los diagnósticos implementados se ofrecerán al SINAVE y en el momento que este lo considere pertinente, se realizará en el InDRE la detección ampliada para otras familias de arbovirus identificados en las Américas, como Bunyavirus (virus Oropuche, La Crosse), Arenavirus hemorrágicos (virus Machupo, Guaranito, Junin, Lassa) (InDRE-SS, 2012).

3.2.2 Muestras recibidas en el laboratorio con ≥ 6 días de haber iniciado la fiebre

Se realiza la prueba de determinación de IgM por ELISA (Panbio No. catálogo E-DEN01M), únicamente para las muestras que tengan 4-5 días de haber iniciado la fiebre. Un resultado positivo confirma el caso. El laboratorio reporta este resultado y da por terminado el algoritmo, no se realiza ninguna otra prueba. En caso de un resultado negativo el laboratorio reporta este resultado y realiza la prueba de determinación de IgG.

Se realiza la prueba de determinación de IgG por ELISA (Panbio No. catálogo E-DEN02G), únicamente para muestras que estén entre 0-3 días, infección reciente (infecciones secundarias). Un resultado positivo confirma el caso. Este resultado precisa que bajo el diseño de la prueba, permite identificar concentraciones muy altas del marcador a analizar, que representan infección reciente y activa como sinónimo de una reinfección por dengue pero por un serotipo diferente al de la primera infección. El laboratorio reporta este resultado y da por terminado el algoritmo, no se realiza ninguna otra prueba. En caso de un resultado negativo el laboratorio reporta este resultado, asegurando que las dos pruebas fueron realizadas y tuvieron un resultado negativo, y se da por terminado el algoritmo.

Una muestra negativa a las dos pruebas previas (IgM, IgG) se considera negativa a dengue y se deberá realizar diagnóstico diferencial, las muestras serán enviadas al InDRE con base en el diagnóstico clínico y previa solicitud de vigilancia epidemiológica estatal (para casos graves y defunciones), ya sea para identificación serológica de flavivirus no dengue o alfavirus como: Virus del Oeste del Nilo, Encefalitis de San Luis, Fiebre Amarilla, Encefalitis Equina del Oeste, del Este y Venezolana, y Virus Chikungunya; además de Enfermedad Febril Exantemática, Leptospira, Rickettsias o Hantavirus (en caso de signos hemorrágicos). Ante casos de fiebre icterohemorrágica se sugiere realizar un diagnóstico diferencial con Fiebre Amarilla a personas que viajaron a zonas endémicas. En zonas endémicas para Leptospira se sugiere realizar la prueba rápida al mismo tiempo que se inicie el algoritmo de dengue. Se solicitará realizar otros diagnósticos pertinentes, según considere el SINAVE (InDRE-SS, 2012).

3.2.3 Resultados indeterminados

En caso de un resultado indeterminado en la prueba de determinación de NS1 por ELISA no se reporta el resultado como indeterminado y se procesa nuevamente la muestra por duplicado como lo indica la técnica, y si se obtiene el mismo resultado (indeterminado) se

realiza la siguiente prueba indicada en el algoritmo. Se reporta el resultado en plataforma una vez que esté activo el campo de resultado indeterminado.

En caso de un resultado indeterminado en la prueba de determinación de IgM por ELISA no se reporta el resultado como indeterminado y se procesa nuevamente la muestra por duplicado como lo indica la técnica, y si se obtiene el mismo resultado (indeterminado) se realiza la siguiente prueba indicada en el algoritmo. Se reporta el resultado en plataforma una vez que esté activo el campo de resultado indeterminado.

En caso de un resultado indeterminado en la prueba de determinación de IgG por ELISA no se reporta el resultado como indeterminado y se procesa nuevamente la muestra por duplicado como lo indica la técnica, y si se obtiene el mismo resultado (indeterminado) se envía al InDRE para referencia donde se realizará inhibición de la hemaglutinación (IH) y microneutralización (MNA) y se incorporarán las dos metodologías como referencia para estos resultados. Se reporta el resultado en plataforma una vez que esté activo el campo de resultado indeterminado. El InDRE reportará sus resultados de referencia una vez que en plataforma se encuentren activos los campos para IH y MNA (InDRE-SS, 2012).

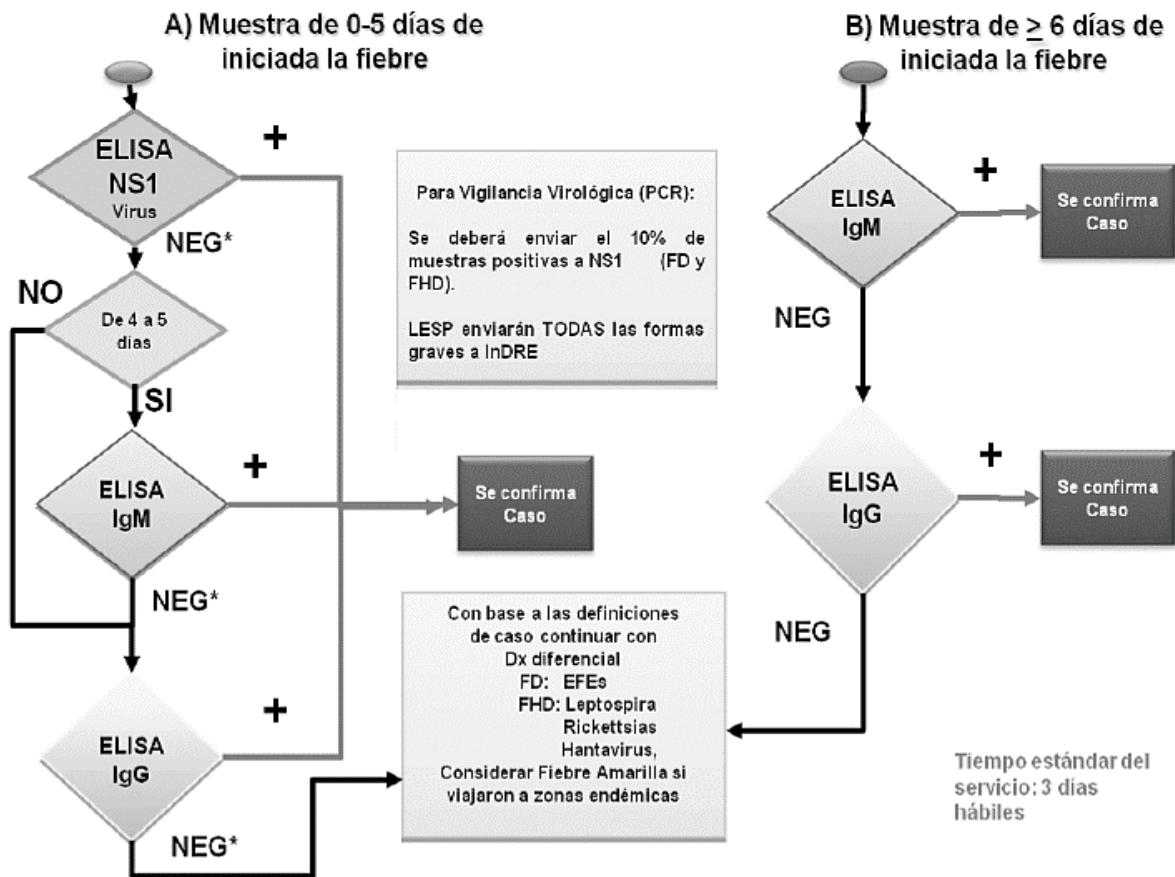


Figura 9. Algoritmo de laboratorio para el diagnóstico de dengue. Fuente: InDRE-SS, 2012

3.2.4 Determinación de material genético mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real

La determinación mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real se aplica únicamente en muestras NS1+ que fueron seleccionadas para su tipificación. En caso de un resultado positivo se reporta el serotipo identificado o serotipos identificados. Como las muestras ya habían sido confirmadas mediante determinación del antígeno NS1, debe ser considerado un caso confirmado. Esta metodología solamente tiene el objetivo de realizar la vigilancia virológica de serotipos circulantes en México.

En caso de un resultado negativo también se informa el resultado. Como las muestras ya habían sido confirmadas mediante determinación del antígeno NS1, debe ser considerado un caso confirmado.

El estándar de servicio para RT-PCR es de 3 días. En caso de extrema urgencia, los resultados son emitidos en 24 horas una vez recibida la muestra en el Laboratorio de Arbovirus y Virus Hemorrágicos del InDRE o en el LESP (InDRE-SS, 2012).

4. RESULTADOS

Se analizaron un total de 121 muestras que resultaron positivas para NS1 (NS1+), de las cuales 64 fueron clasificadas como dengue clásico (52.9 %) y 57 fueron clasificadas como dengue grave con manifestaciones hemorrágicas (47.1 %).

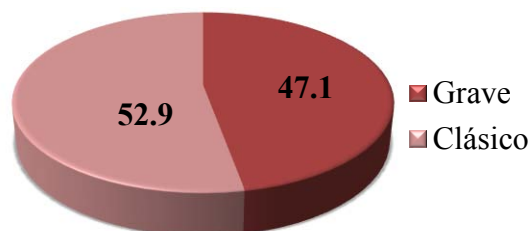


Figura 10. Clasificación de dengue

Al realizarse la tipificación viral de estos casos NS1+ mediante RT-PCR se encontraron 48 casos correspondientes al serotipo DENV1 (39.67 %), 30 casos correspondientes al serotipo DENV2 (24.79 %), 1 caso correspondiente a DENV3 (0.83 %), 1 caso correspondiente a DENV4 (0.83 %), y 41 casos negativos para amplificación de RNA viral (33.88 %).

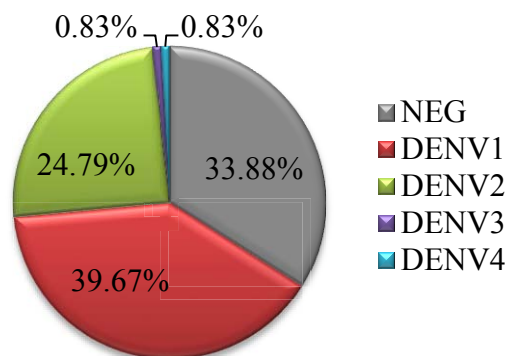


Figura 11. Resultados de tipificación viral

De los 64 casos de dengue clásico, 24 casos corresponden al serotipo DENV1 (37.5 %), 15 casos corresponden al serotipo DENV2 (23.43 %), 1 caso corresponde al serotipo DENV3 (1.57 %), y 24 casos negativos para amplificación de RNA viral (37.5 %). De los 57 casos de dengue grave con manifestaciones hemorrágicas, 24 casos corresponden al serotipo DENV1 (42.11 %), 15 casos corresponden al serotipo DENV2 (26.32 %), 1 caso corresponde al serotipo DENV4 (1.75 %), y 17 casos negativos para amplificación de RNA viral (29.82 %).

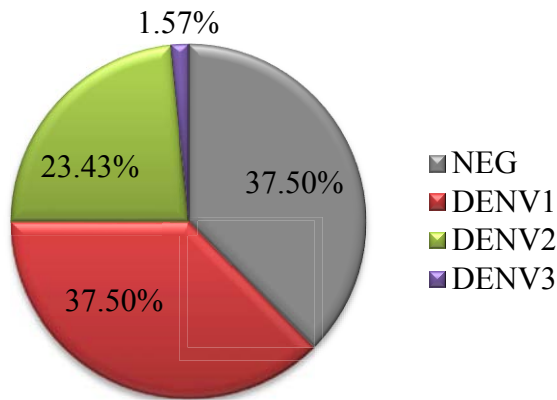


Figura 12. Dengue clásico

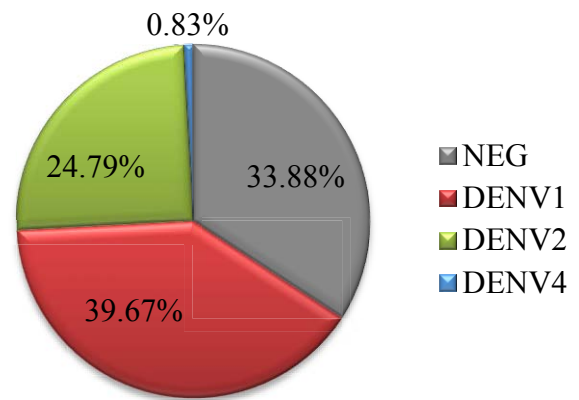


Figura 13. Dengue grave

La edad de los pacientes analizados abarca desde los 9 meses de edad hasta los 88 años. El 20.83 % de los pacientes son menores de edad, el 69.17 % son adultos de entre 18 y 59 años, y el 10 % son adultos mayores. 44 de las 121 muestras analizadas (36.36 %) pertenecen a hombres, mientras que 77 (63.64 %) pertenecen a mujeres. De los 44 casos en hombres, 22 (50 %) corresponden a dengue clásico y 22 (50 %) a dengue grave con manifestaciones hemorrágicas. De los 77 casos en mujeres, 42 (54.55 %) corresponden a dengue clásico y 35 (45.45 %) a dengue grave con manifestaciones hemorrágicas.

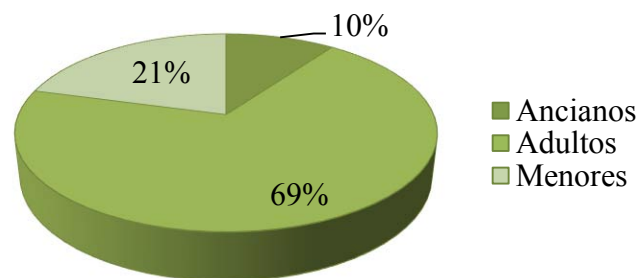


Figura 14. Dengue por edades

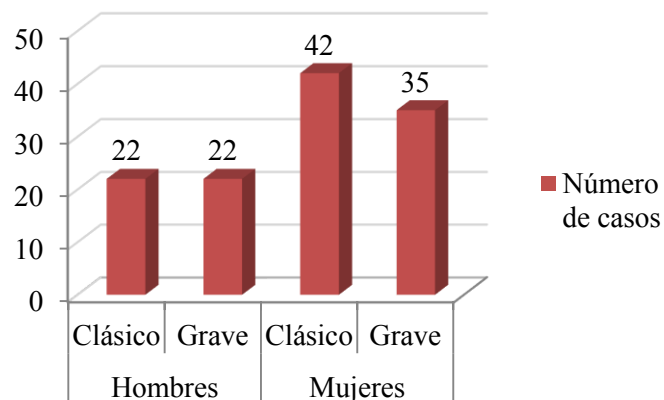


Figura 15. Dengue por sexos

La clasificación de los casos por municipio de residencia del paciente muestra la mayor incidencia de dengue en el municipio de Cárdenas con 38 casos (31.40 %) y presencia de los serotipos DENV1 y DENV2. El municipio de Macuspana le sigue con 21 casos (17.36 %) y presencia de los serotipos DENV1, DENV2 y DENV3. El municipio de Centro cuenta con 19 casos (15.70 %) y presencia de los serotipos DENV1 y DENV2. El municipio de Comalcalco cuenta con 18 casos (14.88 %) y presencia de los serotipos DENV1 y DENV2. El municipio de Huimanguillo cuenta con 10 casos (8.26 %) y presencia de los serotipos DENV1, DENV2 y DENV4. El municipio de Cunduacán cuenta con 3 casos (2.48 %) y presencia del serotipo DENV1. El municipio de Tacotalpa cuenta con 2 casos (1.65 %) y presencia del serotipo DENV2. El municipio de Teapa cuenta con 2 casos (1.65 %) cuyos serotipos no pudieron ser determinados. El municipio de Balancán cuenta con 1 caso (0.83 %) y presencia del serotipo DENV2. El municipio de Emiliano Zapata cuenta con 1 caso (0.83 %) y presencia del serotipo DENV1. El municipio de Jalapa cuenta con 1 caso (0.83 %) y presencia del serotipo DENV1. El municipio de Paraíso cuenta con 1 caso (0.83 %) cuyo serotipo no pudo ser determinado. El municipio de Tenosique cuenta con 1 caso (0.83 %) y presencia del serotipo DENV1. Los municipios de Centla, Jalpa de Mendez, Jonuta y Nacajuca no presentaron casos en este periodo. Adicionalmente, 3 casos (2.48 %) corresponden a pacientes provenientes del estado de Chiapas que fueron tratados por instituciones de salud del estado de Tabasco y presentan los serotipos DENV1 y DENV2.

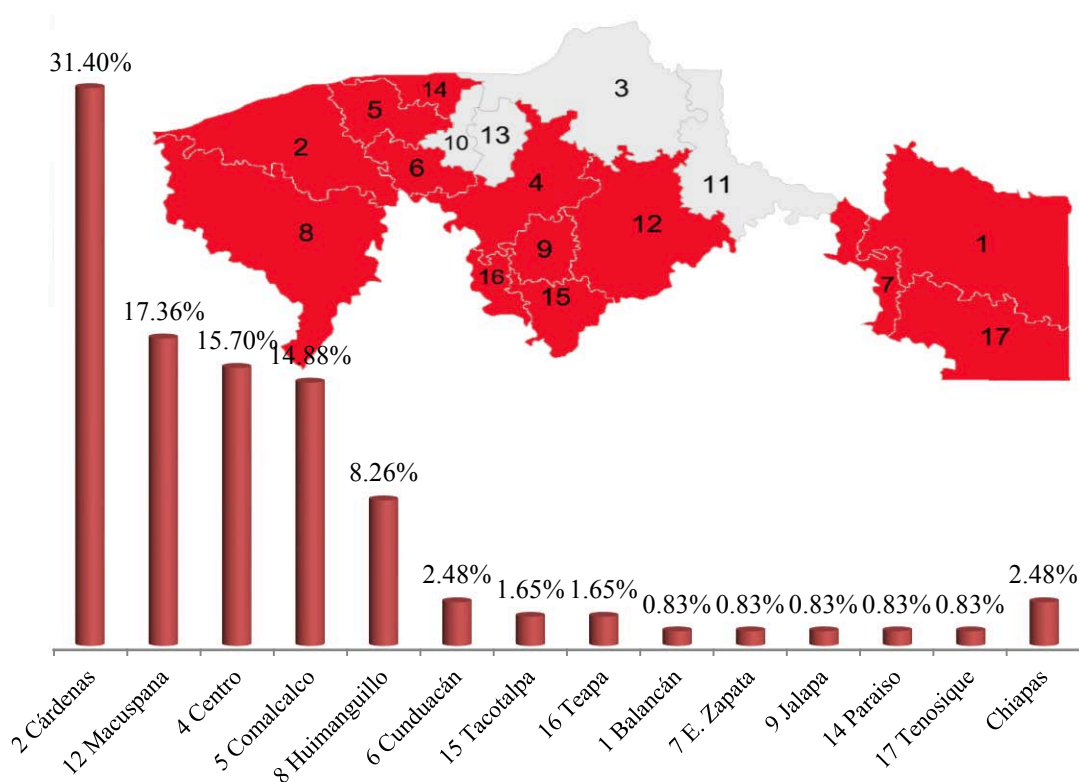


Figura 16. Dengue por municipios

Tabla 1. Resultados de pruebas serológicas de diagnóstico de dengue

Municipio	Tipo	Sexo		Serotipo				(-)
		M	F	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
Cardenas (38 casos)	Clásico	5	5	6	2			2
	Grave	11	17	13	9			6
Macuspana (21 casos)	Clásico	7	12	6	5	1		7
	Grave	1	1	2				
Centro (19 casos)	Clásico	3	6	6	1			2
	Grave	6	4	5	2			3
Comalcalco (18 casos)	Clásico	5	11	4	3			9
	Grave	1	1		1			1
Huimanguillo (10 casos)	Clásico							
	Grave	2	8	1	3		1	5
Cunduacan (3 casos)	Clásico		1	1				
	Grave		2					2
Tacotalpa (2 casos)	Clásico		2		1			1
	Grave							
Teapa (2 casos)	Clásico	1	1					2
	Grave							
Balancan (1 caso)	Clásico		1		1			
	Grave							
E. Zapata (1 caso)	Clásico		1	1				
	Grave							
Jalapa (1 caso)	Clásico							
	Grave		1	1				
Paraiso (1 caso)	Clásico		1					1
	Grave							
Tenosique (1 caso)	Clásico							
	Grave		1	1				
Chiapas (3 casos)	Clásico	1	1		2			
	Grave	1		1				
TOTAL	Clásico	22	42	24	15	1	0	24
	Grave	22	35	24	15	0	1	17

5. DISCUSIÓN

De acuerdo a lo establecido en los lineamientos para el diagnóstico de dengue empleados en el LESP, el algoritmo vigente requiere que la primera prueba de diagnóstico realizada a las muestras de 0-5 días de iniciada la fiebre que ingresan al laboratorio sea la prueba de determinación de antígeno viral (NS1). Un resultado positivo implica confirmación inmediata del caso, haciendo redundantes las pruebas de determinación de IgM e IgG por ELISA. Un caso negativo, por otro lado, implica la realización de dichas pruebas serológicas de manera secuencial para poder realizar un diagnóstico, siendo confirmatorio cualquier resultado positivo. Para el caso de las muestras de ≥ 6 días de iniciada la fiebre se requiere inicialmente la realización de la prueba de determinación de IgM por ELISA para confirmar un caso con un resultado positivo, o en caso de un resultado negativo realizar la prueba de determinación de IgG por ELISA para confirmar o descartar un caso de dengue.

Esta elección de metodología obedece principalmente a la necesidad de asegurar que el diagnóstico de la infección por el DENV sea realizado de la manera más rápida y barata posible, empleando pruebas eficaces capaces de brindar resultados oportunos y confiables.

De acuerdo a estudios de pruebas de diagnóstico de infección aguda de dengue (Blacksell, 2008), la sensibilidad de diagnóstico de las pruebas Panbio (E-DEN01M, E-DEN02G, E-DEN01P) empleadas individualmente se encuentra entre 45 %-63 % para infecciones agudas por lo que resultan inadecuadas para su uso como prueba única de diagnóstico. La prueba de determinación de antígeno viral (NS1) es mucho menos sensible (5 %) en muestras de pacientes convalecientes, mientras que la prueba de determinación de IgM por ELISA es mucho más sensible (58 %) en muestras de pacientes convalecientes. Por este motivo se recomienda el uso simultáneo tanto de la prueba de determinación de antígeno viral (NS1) y de la prueba de determinación de IgM por ELISA, lo que aumenta la sensibilidad del diagnóstico hasta un 71 % en todo tipo de muestras. Adicionalmente, el uso de la prueba de determinación de IgG por ELISA complementa el perfil de diagnóstico al permitir detectar infección en pacientes con más de 6 días de iniciados los síntomas. Comparada con otras pruebas disponibles en el mercado, las pruebas Panbio ofrecen una sensibilidad individual ligeramente inferior a un menor precio, pero esta desventaja es anulada por el uso conjunto de varias pruebas (Dussart, 2008).

La prueba de determinación de material genético viral mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real se emplea para detectar el genoma viral en suero con una sensibilidad entre 80 %-90 %. Su principal ventaja sobre otras variantes de la RT-PCR, como la RT-PCR anidada y Singleplex es el menor tiempo requerido para la obtención de resultados, aproximadamente 3 horas para la RT-PCR Multiplex comparada con las 10 horas o más que requiere una RT-PCR anidada, por realizarse la prueba en un solo paso (Johnson, 2005).

Los resultados de la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real obtenidos en el LESP Tabasco, sin embargo, mostraron una sensibilidad muy por debajo de los valores reportados, resultando positivos a amplificación de RNA viral 80 (66.12 %) de los casos previamente confirmados de dengue mediante pruebas serológicas, con 41 casos (33.88 %) negativos a amplificación de RNA viral. Los lineamientos de laboratorio vigentes establecen que dichos resultados solamente tienen el objetivo de realizar la vigilancia virológica de serotipos circulantes en el país, por lo que la incapacidad de tipificar el 33.88 % de los casos carece de impacto en el diagnóstico. El apego a los lineamientos para el diagnóstico observado en el laboratorio es estricto, por lo que todo parece indicar que la causa de esta disminución en la sensibilidad de la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real con respecto a la reportada en la literatura es atribuible a la degradación del material genético viral debida a las altas temperaturas prevalentes en la región y a la disminución de carga viral en plasma obtenido en la fase aguda.

El análisis comparativo de manifestaciones clínicas y serotipos de DENV revela una serie de datos de gran valor para el análisis epidemiológico de la enfermedad en el estado de Tabasco.

Es posible apreciar que la proporción entre los casos de dengue clásico y dengue grave reportados es muy similar, con 64 casos (52.9 %) de dengue clásico y 57 casos (47.1 %) de dengue grave. Por otro lado, los resultados de tipificación viral muestran una prevalencia de los serotipos DENV1 (39 %) y DENV2 (25 %) muy superior a la de los serotipos DENV3 (1 %) y DENV4 (1 %), que fueron identificados una sola vez cada uno en el estado a lo largo del año.

El análisis de la edad de los pacientes con dengue refleja lo anteriormente expuesto por la literatura al respecto de los grupos demográficos más vulnerables al dengue. El grupo que sufre el mayor riesgo de contraer la enfermedad en cualquiera de sus manifestaciones clínicas es el de los adultos de entre 18 y 59 años, ya que estos representan un 69 % de los casos diagnosticados. El siguiente grupo en mayor riesgo es el de los niños, con un 21 % de casos, y por último el grupo de los ancianos, con un 10 % de los casos.

La comparación de la clasificación de los casos de dengue con los sexos de los pacientes nos permite determinar que no existen marcadas diferencias entre hombres y mujeres a la hora de desarrollar la enfermedad en todas sus manifestaciones clínicas. El porcentaje de hombres que desarrollan dengue clásico y dengue grave es de 50 % para ambas manifestaciones clínicas. El porcentaje de mujeres que desarrollan dengue clásico (54.55 %) y dengue grave con manifestaciones hemorrágicas (45.45 %) es muy parecido al porcentaje encontrado de probabilidad de desarrollar dengue clásico (52.9 %) y dengue grave con manifestaciones hemorrágicas (47.1 %) para el total de la población.

A través del análisis de la prevalencia de dengue en los distintos municipios del estado de Tabasco es posible observar en cuales se dan el mayor número de casos diagnosticados y serotipificados. Durante el periodo de estudio la mayor prevalencia de dengue se pudo observar en el municipio de Cárdenas, con un 31.40 % de los casos, seguido por Macuspana con 17.36 %, Centro con 15.70 % y Comalcalco con un 14.88 %. Posteriormente les siguió Huimanguillo con 8.26 %, y los municipios de Cunduacán, Tacotalpa, Teapa, Balancán, Emiliano Zapata, Jalapa, Paraíso y Tenosique. El análisis también reveló que si bien en la mayoría de los municipios la proporción de casos de dengue clásico y dengue grave con manifestaciones hemorrágicas se mantiene similar a la que se observa en la población general, en el municipio de Huimanguillo se observaron únicamente casos de dengue grave con manifestaciones hemorrágicas.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Para el presente trabajo se propuso evaluar las distintas pruebas serológicas de diagnóstico de dengue contempladas por los lineamientos para el diagnóstico de dengue vigentes en el Laboratorio de Salud Pública del Estado de Tabasco con el fin de determinar su eficacia. Las pruebas serológicas de diagnóstico empleadas en el LESP Tabasco son: la prueba de determinación de antígeno viral (NS1), la prueba de determinación de IgG por ELISA, la prueba de determinación de IgM por ELISA, y la prueba de determinación de material genético viral mediante RT-PCR Multiplex en tiempo real.

Actualmente, las técnicas básicas empleadas para el diagnóstico de infección por DENV en la mayoría de los laboratorios son el aislamiento viral, detección del material genético viral mediante una prueba de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR), y la detección de anticuerpos IgM o IgG específicos contra el virus. Las pruebas empleadas en el LESP (ELISA NS-1, IgG, IgM y RT-PCR Multiplex en tiempo real) corresponden a las consideradas por la OMS como las más recomendables para llevar a cabo el diagnóstico de dengue en la población debido a sus excelentes características de sensibilidad cuando son usadas en conjunto, su facilidad de uso y la rapidez con la que permiten obtener resultados.

A primera vista no parece existir ninguna relación significativa entre el serotipo causante de la infección y la manifestación clínica observable en el paciente. Existe una correspondencia porcentual entre los casos de dengue clásico y dengue grave atribuibles a los serotipos DENV1 y DENV2, mientras que al solo encontrarse un caso de los serotipos DENV3 y DENV4 respectivamente es imposible establecer una mayor comparación. Por lo tanto es posible afirmar que el serotipo responsable de la infección no tiene ningún impacto directo en el tipo de manifestación clínica, dengue clásico o grave, que desarrolla el paciente. Por lo tanto, el desarrollo de estas manifestaciones debe depender de otros factores, como la edad, la condición física y factores genéticos del individuo.

A pesar de una aparente disminución de la sensibilidad de la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real a la hora de analizar las muestras, comparada con la sensibilidad reportada en la literatura, los resultados obtenidos fueron suficientes para establecer la tipificación viral e identificar los serotipos circulantes en la población. Gracias a este método fue posible determinar que los 4 serotipos de DENV se pueden encontrar en la entidad, con una significativa preponderancia de los serotipos DENV1 y DENV2; por lo que es necesario mantenerse alerta ante posibles brotes que puedan resultar en infecciones secundarias de la población con un segundo serotipo más raro como es el caso de DENV3 y DENV4.

Mediante el análisis conjunto de los resultados obtenidos de las pruebas empleadas en el LESP Tabasco para el diagnóstico de infección por DENV y las pruebas de tipificación viral es posible establecer relaciones entre los serotipos de dengue presentes en la población y las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes, ya que el algoritmo vigente para

el diagnóstico de dengue permite detectar los casos sospechosos de manera sistemática y eficiente, para posteriormente realizar una tipificación de casos positivos a la prueba de determinación de antígeno viral NS1, el cual evidencia la presencia de partículas virales cuyo RNA puede ser posteriormente determinado mediante la prueba de RT-PCR Multiplex en tiempo real.

Debido a limitaciones de carácter operativo, el número de muestras destinadas a la vigilancia epidemiológica de dengue en México es muy reducido y por lo tanto las observaciones que se pueden realizar a partir de los resultados de la tipificación viral son principalmente de carácter cualitativo. Entre los beneficios de un grupo muestral reducido se encuentran la reducción de costos de recolección, almacenamiento y procesamiento de muestras, así como la rapidez con la que se pueden recopilar los resultados analíticos. Ante esta situación, es posible obtener un panorama de los serotipos circulantes en la población, a pesar de las limitantes estadísticas.

Gracias a la facilidad con la que es posible elaborar un panorama claro y representativo de la incidencia y prevalencia de una enfermedad en una población determinada, sería interesante aplicar esta metodología de análisis estadístico a otras enfermedades emergentes que constituyen un riesgo sanitario para la población mexicana, y específicamente a otras enfermedades causadas por arbovirus tales como la fiebre amarilla y la fiebre Chikungunya. Adicionalmente, es posible aplicar este modelo de análisis en otros estados de la república.

Una de las recomendaciones que se podría hacer al respecto de la metodología vigente para el diagnóstico de dengue en el estado de Tabasco con base en este estudio es la de evaluar cuidadosamente los protocolos operativos de RT-PCR Multiplex para asegurar que exista un menor retraso entre la obtención de las muestras y su análisis, con el objetivo de minimizar el error sistemático que pueda ocurrir durante el procesamiento de las muestras y así elevar la sensibilidad de la prueba a los niveles reportados por la literatura. Además, cabría estudiar la posibilidad de adquirir pruebas de diagnóstico de dengue de la marca Bio-Rad, ya que exhiben una sensibilidad mayor que las pruebas Panbio utilizadas actualmente en el LESP. Finalmente, con la finalidad de optimizar la capacidad de realizar un análisis estadístico más completo haciendo uso de información demográfica actualizada, se recomienda entablar una relación más estrecha entre el InDRE y el INEGI. Dicha cooperación permitiría dar una dimensión adicional al análisis epidemiológico, tomando en cuenta la incidencia de casos de dengue en los distintos grupos etarios para establecer la relación existente entre el porcentaje de casos y el porcentaje poblacional en cada grupo.

En conclusión, las pruebas serológicas de diagnóstico de dengue contempladas dentro de los lineamientos vigentes en el LESP Tabasco resultan eficaces y confiables, y le permiten a esta institución estar al mismo nivel de la mayoría de los laboratorios clínicos nacionales e internacionales.

7. REFERENCIAS

- Acosta-Bas, C., Gómez-Cordero, I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed.* 16(2):113-137. [En línea] Recuperado el 15 de diciembre de 2015 de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb051626.pdf>
- Anderson, N. W., Jespersen, D. J., Rollins, L., Seaton, B., Prince, H. E., Theel, E. S. (2014). Detection of the dengue virus NS1 antigen using an enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 79(2):194-197.
- Blacksell, S. D., Mammen, M. P., Jr, Thongpaseuth, S., Gibbons, R. V., Jarman, R. G., Jenjaroen, K., Nisalak, A., Phetsouvanh, R., Newton, P. N., Day, N. P. (2008). Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(1):43-49.
- Bureau International des Poids et Mesures. (2006). The International System of Units (SI). [En línea] Recuperado el 15 de diciembre de 2015 de: <http://www.bipm.org/en/publications/si-brochure/>
- DOF. (2011). Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010. Diario Oficial de la Federación, 1° de junio de 2011.
- Dussart, P., Petit, L., Labeau, B., Bremand, L., Leduc, A., Moua, D., Matheus, S., Baril, L. (2008). Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2(8), e280.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., Klapper, P. E. (2000) Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev.* 13(4):559-570.
- Gubler, D. J. (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev.* 11(3):480-496.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegrino, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. Recuperado el 7 de diciembre de 2015 de: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n12_supp/pdf/nrmicro2460.pdf
- Holmes, E. C., Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 3(1), 19-28.
- InDRE-SS. (2012) Lineamientos de laboratorio para la vigilancia epidemiológica de dengue. Versión No. 02. DGE-InDRE-RNLSP. Recuperado el 29 de diciembre de 2015 de: http://www.epidemiología.salud.gob.mx/doctos/sinave/ve_lab/LINEAMIENTOS_DENGUE_2012.pdf
- Johnson, B. W., Russell, B. J., Lanciotti, R. S. (2005). Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 43(10):4977-4983.
- Murray, N. E., Quam, M. B., Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 5, 299-309.
- Navarrete-Espinosa, J., Gómez-Dantés, H. (2006). Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 44(4):347-353.
- OMS/TDR. (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Nueva edición 2009.
- Ospina, M. C. (2004). Dengue. Diagnóstico por el laboratorio. *Infectio.* 8(3):225-230.
- Pizarro, D. (2009). Dengue, dengue hemorrágico. *Acta Pediátr Costarric.* 21(1):8-17.
- UNAD (2010). Resultados de la hemaglutinación ocasionada por el virus de la influenza [fotografía]. Recuperado el 15 de diciembre de 2015 de: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203016/Modulo_EXE/leccin_7_aislamiento_deteccin_y_cuantificacin_de_virus.html
- Velandia, M. L., Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio.* 15(1):33-43.