

118  
21



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## ESTUDIO SEROLOGICO DE UN BROTE DE DEN- GUE EN LA POBLACION DE MOCHITLAN ESTADO DE GUERRERO, MEXICO

FALLA DE ORIGEN

### TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE RAMOS CASTAÑEDA



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| INTRODUCCION.....         | pag. 3  |
| MATERIALES Y METODOS..... | pag. 17 |
| RESULTADOS.....           | pag. 27 |
| DISCUSION.....            | pag. 30 |
| CONCLUSIONES.....         | pag. 37 |
| REFERENCIAS.....          | pag. 38 |
| APENDICE.....             | pag. 44 |

11 ENE. 1990

**TRABAJO PARA SER REVISADO  
POR EL JURADO**

|        |               |         |                             |
|--------|---------------|---------|-----------------------------|
| JURADO | Presidente    | Profra: | Magdalena Acosta Segura     |
|        | V o c a l     | Prof :  | Celso Ramos García          |
|        | Secretario    | " :     | Salvador Martín Sosa        |
|        | 1er. Suplente | " :     | Alejandro Landa Quezada     |
|        | 2do. Suplente | " :     | Guillermo González Villamar |

Sítio donde se desarrolló la tesis: Departamento de Inmunología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Asesor: Dr. Celso Ramos García.

Sustentante: José Ramos Castañeda.

A handwritten signature in black ink is written over a rectangular stamp. The signature is cursive and appears to be 'J. Ramos Castañeda'. The stamp contains the text 'J. R. C.' in a stylized font.

## INTRODUCCION

El Dengue es una virosis aguda causada por alguno de los cuatro serotipos del virus del mismo nombre (1), el cual es transmitido al humano por la picadura del mosquito Aedes aegypti (1,2). La enfermedad se presenta predominantemente entre los paralelos 30 N a 20 S y no más allá de 1500 metros sobre el nivel del mar (1,3). Es una enfermedad de distribución mundial; si se considera que la tasa de infección anual en zonas endémicas es del 10 %, se puede estimar que hay en el mundo más de 100 millones de casos de dengue. En México los primeros informes de la enfermedad se presentaron en el sureste del país en 1978 (4) a partir de esa fecha ha aumentado la distribución y el número de casos (4,5), sin embargo el número real de casos de dengue en el país se desconoce (5,6), entre otras razones por que las pruebas diagnósticas necesarias para la confirmación de los casos requieren de una infraestructura que no siempre es posible tener en los lugares donde se presentan los casos y, por otra parte, de personal debidamente entrenado. En América latina, según datos de 1987, México ocupa el segundo lugar en casos reportados, sin embargo, en opinión de varios investigadores (5,6) el número de casos podría ser mayor ya que existe una alta proporción de casos asintomáticos, de que las estadísticas disponibles están subestimadas y de que en el territorio nacional circula tres serotipos del virus. Como se veera mas adelante, la forma severa de la enfermedad se presenta asociada a la frecuencia de infección y al serotipo causante de ella; por lo que es muy importante conocer la respuesta inmune al virus en la población

susceptible y la circulación de serotipos en esa población. En el Estado de Guerrero se encuentra una zona de alta endemicidad para esta infección por lo que resulta un lugar conveniente para realizar estudios de vigilancia epidemiológica, por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo:

Analizar la prevalencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el virus del dengue, así como aislar e identificar al virus en muestras únicas de suero de individuos durante un brote de dengue en la población de Mochitlan, Estado de Guerrero.

De ser ciertas las premisas antes mencionadas, esperamos tener una alta prevalencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y describir la variedad de serotipos del virus que circulan en esa entidad.

#### GENERALIDADES

Los primeros reportes de dengue en América se remontan a 1635 cuando los colonizadores franceses en las Indias Occidentales reportaron una extraña dolencia que llamaron Coupe de barre. El término dengue fue introducido a la literatura médica como una traducción del swahili: dinga, dyenga o li denga pogo, que describe "un golpe súbito causado por un espíritu maligno". Los diferentes términos de knokkel-koorts dado en Indonesia en 1779, y el de breakbone fever o dandy fever dado en Filadelfia en 1780 fueron términos utilizados para describir la enfermedad que ahora conocemos como dengue (6,7).

Existe una susceptibilidad universal a la infección por los virus dengue. El espectro clínico de la enfermedad es muy amplio

y dependiente de la edad. En los niños la infección por dengue es poco reconocible. Se estima que 4 de 10 infecciones cursan asintomáticas (6-9) y que un cuadro febril ocurre en el resto después de 2 a 7 días de incubación. El cuadro clínico en los infantes se caracteriza por enrojecimiento de orofaringe, una rinitis moderada, tos, molestias gastro intestinales leves, por lo que muchas veces se diagnostica como faringitis, influenza, sarampión u otras infecciones de vías respiratorias altas (8). En jóvenes y adultos el dengue se manifiesta como un cuadro más típico o "clásico" caracterizado por un cuadro febril de más de 2 días de duración acompañado por dolor retro ocular, dolor de espalda, dolor en músculos y articulaciones y conjuntivitis. Durante el período febril se pueden presentar náuseas y vómito linfadenopatía, parestesias cutáneas, edema palmar, cambios en el gusto, anorexia, constipación y depresión que puede llegar a ser severa y prolongada. Es común que aparezca un exantema morbiliforme que dura de 1 a 5 días (6,8). La aparición de epistaxis o petéquias es poco frecuente y varía con el brote, la edad, el sexo y las cepas del serotipo responsable.

La Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD) fueron reconocidos por primera ocasión en Australia en 1897 y en Grecia en 1928 (6). La enfermedad progresa de un cuadro de dengue clásico seguido por debilidad y colapso físico. En la segunda etapa el paciente presenta extremidades frías y el tronco caliente, enrojecimiento facial y diaforésis, irritabilidad e inquietud. Es posible encontrar petéquias aisladas y equimosis, fragilidad capilar y sangrados espontáneos internos y externos sobre todo en los sitios de venopunción. La

acrosianosis y la hiperventilación son signos frecuentes; el pulso es rápido, débil y filiforme. Para concordar con los criterios diagnósticos de la Organización Mundial de la Salud el paciente con FHD/SCD debe presentar trombocitopenia (menos de 100,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) y un hematocrito elevado un 20 % del valor normal. La leucopenia (menos de 5,000 leucocitos/ml) puede aparecer al final del periodo febril. En los casos graves el paciente desarrolla un cuadro subitito de choque hipovolemico que puede conducir a la muerte de no tratarse oportunamente (8).

El virus del dengue, que anteriormente formaba parte del género Flavivirus (familia Togaviridae), ha sido reclasificado recientemente junto con los otros miembros de este género en la familia Flaviviridae (10). Este virus es envuelto y tiene forma esferica con un diametro de 50 nm. El genoma viral consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, con coeficiente de sedimentación de 45 S y un peso molecular de 4 Kd y su genoma consta de aproximadamente 11 Kilobases (11,12). El genoma codifica para tres proteínas estructurales y para un número no determinado de proteínas no estructurales (12). Las tres proteínas estructurales son : V2/C de 14 Kd que es un polipeptido básico que interactua con el RNA viral dando lugar a la nucleocápside; V1/M de 8 Kd de la cual se desconoce su función, aunque se especula que pueda interaccionar tanto con el complejo V2/C-RNA como con V3/E que es la tercera proteína estructural; la cual tiene un peso molecular de 50-60 Kd, es una glicoproteína que forma parte de la envoltura del virus, en esta proteína se encuentran los determinates antigénicos de serotipo, complejo y



grupo, así como varias funciones del virus tales como: neurotropismo, unión a receptores celulares, neutralización, etc. (12-14).

Las células infectadas por el virus muestran un período de eclipse de aproximadamente 12 horas y no se ha detectado bloqueo de la biosíntesis de macromoléculas de la célula huésped (11,14). El virus se replica principalmente en células del sistema retículo endotelial (Monocitos/Macrofagos) (13-15). El antígeno viral se puede detectar en el citoplasma de leucocitos mononucleares de la piel, bazo, ganglios linfáticos, sinusoides hepáticos, alveolos y corteza tímica (16). También se ha encontrado antígeno viral en linfocitos B circulantes en enfermos con FHD (17). El tropismo del virus por células del sistema fagocítico mononuclear ha sido demostrado en monos y también en experimentos in vitro (16,18). La replicación del virus se incrementa progresivamente en el tejido linfoide y en leucocitos y llega a su máximo cuando termina la fase de la viremia. Se ha observado que en el suero de pacientes con Dengue se incrementan los niveles de fosfatasa ácida proveniente de osteoclastos, lo que sugiere que estas células también puedan permitir la replicación del virus, lo cual puede explicar las artralgias que se asocian con esta enfermedad (19). De casos fatales por FHD/SCD se han podido aislar virus de diversos órganos, tales como hígado, corazón, ganglios linfáticos, pulmón y médula ósea (20). Algunos serotipos del virus tienen marcado neurotropismo en ratón y presentan una patología similar a la de otros virus neurotrópicos. El dengue 2 tiene neurotropismo en el ratón lactante y es capaz de replicarse en cultivo de neuronas de

ratón, además se ha detectado al virus infeccioso en el bazo, cerebro, médula espinal y músculo esquelético de ratones infectados experimentalmente (5).

Para explicar la presentación de las formas de FHD/SCD, se han propuesto dos hipótesis. La primera propone que los virus pueden presentar diferentes grados de virulencia como consecuencia de una variación genética que pueda estar relacionada directamente con las manifestaciones graves de la enfermedad. Esta hipótesis fue propuesta por Leon Rosen en 1974 (21). La segunda fue propuesta por Scott Halstead en 1979 y sostiene que la existencia previa de anticuerpos producidos durante una infección primaria contra un serotipo y la siguiente reinfección con un serotipo diferente (infección secuencial heteróloga) en un tiempo determinado, son condiciones importantes para que puedan presentarse manifestaciones graves de la enfermedad (1,18,22).

La primera hipótesis se apoya en las observaciones hechas durante un brote de dengue en la Isla Nieu en 1972 asociada con casos fatales con infección primaria causado por dengue 2. Estas observaciones sugieren que algunas cepas de el virus pueden poseer un elevado potencial virulento capaz de causar cuadros graves. El fenómeno de variación antigénica ha sido demostrado en otros virus de la familia Flaviviridae entre los cuales se encuentran los virus de la encefalitis japonesa, fiebre amarilla y encefalitis de San Luis. Los diferentes serotipos del virus del Dengue muestran una variación antigénica principalmente en la proteína de envoltura (V3/E) y actualmente se han descrito varios

subserotipos de dengue 1, 2 y 4 que representan variantes antigénicos (23-25). La variación de estos virus en virulencia y marcadores antigénicos, refleja la alta tasa de mutación en su genoma y subraya la importancia de la evolución de estos virus en relación con los aspectos epidemiológicos de las enfermedades causadas por ellos (23).

La segunda hipótesis tiene un amplio respaldo en hallazgos epidemiológicos y es la más ampliamente aceptada. Así por ejemplo, se ha demostrado que las reinfecciones por los serotipos 2, 3 o 4 se asocian más frecuentemente con manifestaciones hemorrágicas severas cuando los individuos han estado previamente en contacto con el serotipo 1 (1,22,26). Halstead propuso que la patogénesis central del FHD/SCD radica principalmente en que los anticuerpos (IgG) preformados no neutralizantes y heterotípicos ( anticuerpos "facilitadores" ) forman un complejo anticuerpo-virus que facilita la unión y la infección en monocitos, lo que permite una amplificación progresiva de la replicación viral en estas células (1,22,26,27). Las evidencias in vivo que sugieren la participación de anticuerpos facilitadores en la enfermedad, se han obtenido de estudios hechos en monos en los cuales se observó que la viremia y la presencia del virus en los tejidos fueron más altas en los animales que tenían anticuerpos preformados. Por otro lado, los leucocitos de sangre periférica de humanos y monos inmunes, muestran un mayor título de replicación del virus que los leucocitos de los sujetos no inmunes (1,22,26,27).

El riesgo de padecer FHD/SCD en casos de infecciones secundarias es de 1 a 6 %, que es 100 veces más alto que en casos de infecciones primarias. Entre los factores de riesgo que se han

identificado destacan los siguientes: personas jóvenes (menores de 15 años), sexo femenino, buen estado nutricional, un intervalo menor de cinco años entre la infección primaria y la secundaria, la secuencia de infección y la cepa de virus (1,26). La mayor incidencia de FHD en personas blancas que en los de raza negra, observada durante la epidemia de dengue hemorrágico en Cuba (1981), sugiere la posible participación de factores genéticos; sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna asociación de esta enfermedad con antígenos HLA (28).

La epidemia de FHD/SCD en Cuba apoyo la hipótesis de que las formas graves de la enfermedad ocurren en las infecciones secundarias y no en las infecciones primarias. Así, en ese país no se habían reportado casos de dengue desde la segunda guerra mundial, hasta que en 1977-1978 se presentó una epidemia de dengue 1 que afectó al 40 % de la población total; la forma predominante de esta enfermedad fue benigna. En 1981 se introdujo en Cuba el serotipo 2 y las muestras pareadas de sueros obtenidos durante la epidemia de pacientes con FHD/SCD mostraron una respuesta secundaria de anticuerpos. Como era de esperarse, los niños de 1 a 2 años de edad no presentaron FHD/SCD ni requirieron hospitalización; estos niños nacieron después de la epidemia por dengue en 1977-1978, de tal modo que estuvieron solamente expuestos al serotipo 2.

Hasta la fecha ha sido difícil esclarecer los verdaderos mecanismos que expliquen el origen de las formas graves de la enfermedad; sin embargo, es posible que varios factores como la virulencia de la cepa del virus, las infecciones secuenciales

heterólogas, el estado inmune del huésped, la densidad del vector etc., puedan coadyuvar a la presentación de las formas graves de la enfermedad (5,29,30).

El dengue es transmitido al humano por la picadura de la hembra hematófaga del mosquito Aedes aegypti (1,2). El mosquito pica durante el día y puede transmitir el virus inmediatamente o después de un período de 8 a 10 días, tiempo durante el cual, el virus, se multiplica en las glándulas salivales. Por otro lado, este virus puede ser transmitido transovarialmente por ciertas especies de Aedes (31). Este fenómeno puede permitir el mantenimiento natural del virus y puede explicar por que el virus es capaz de mantenerse activo durante largos períodos interepidemicos. Recientemente el mosquito A. albopictus ha sido introducido al continente americano y se ha detectado en 15 estados de Estados Unidos y en tres estados de Brasil (32). Si este vector participa de manera importante en la transmisión del dengue en las Américas, es posible que se modifique el patrón de la enfermedad, como sucede en el sudeste asiático, donde este vector es el más importante en la transmisión del virus y donde se presentan muchos casos de FHD/SCD.

El A.aegypti es un mosquito doméstico altamente antropofílico y prefiere depositar sus huevecillos en recipientes de color oscuro y de diametro ancho, especialmente aquellos que se localizan en areas sombreadas. Los huevecillos se depositan en los recipientes en cantidades que varían entre 30 y 50 por oviposición, justamente por arriba del nivel del agua y son capaces de resistir la desecación (2), tienen una longitud menor a 1 mm y al principio son de color blanco pero después de dos

horas se tornan de color obscuro (2). Las larvas pueden madurar en un período de dos a tres días cuando la humedad es alta cerca del nivel del agua; las larvas viven en agua transparente y la pupa se desarrolla en cinco a diez días, para emerger como adultos dos días más tarde. En condiciones favorables, el ciclo de vida de este mosquito se puede completar en diez días. El habitat de las larvas son los depósitos de agua tales como; recipientes de metal, barriles, cisternas, hoyos en los arboles y en las rocas, llantas de automóvil y de bicicleta, etc. la eliminación de estos criaderos disminuye considerablemente la transmisión de la enfermedad. Los mosquitos pican silenciosamente preferentemente en los tobillos, codos, parte posterior de las rodillas y del cuello. El mosquito adulto tiene un radio de vuelo no mayor de 100 m (2).

#### EPIDEMIOLOGIA

Asia tropical es la región de más alta endemicidad, la infección es más severa y frecuente, se presenta como FHD/SCD y afecta principalmente a los niños (menores de 15 años). A la fecha se han reportado por lo menos 1.5 millones de casos entre los niños que han requerido hospitalización y 33 000 han fallecido por SCD desde que se reconoció como problema de salud pública en los años cincuenta (22,33).

La infección por dengue ha sido endémica en América por más de 200 años. La primera epidemia de dengue se reportó en 1827. La segunda se detectó en Charleston, Carolina del Sur en 1850. Las formas severas y hemorrágicas del dengue se reportaron durante las epidemias en Texas en 1885-86, en Cuba en 1987 y en el Caribe

en 1922. Las primeras epidemias estudiadas en la región latinoamericana y el Caribe ocurrieron en Panamá en 1904-12, después en 1917 en Saint Thomas y en 1922 durante una epidemia con mas de un millón de casos en la frontera mexicano estadounidense (6).

En 1941-42 Panamá sufrió una epidemia de dengue causada por el serotipo 2 (34,35). Este serotipo se desplazó lentamente a lo largo del Caribe y para 1958 se observó que el 23.3 % de la población en ciertas regiones de Colombia tenían una respuesta positiva de anticuerpos neutralizantes a este serotipo (6,34). Para 1977, en Jamaica, ya se encontraba circulando el serotipo 1; durante este año Puerto Rico reportó 224,000 casos y en 1978 reporto 450,000 (36). Esta epidemia se traslado del Caribe hasta América Central y México hasta su frontera con Estados Unidos. En abril de 1981 el serotipo 4 se identificó por primera vez en la región del caribe en dos ciudadanos americanos que viajaron a San Bartolome y St. Martin (6). Durante 1982-83, El Salvador reportó más de 10,000 casos causados por este serotipo. Poco tiempo después la transmisión de este serotipo se detecto en Puerto Rico, Jamaica, Trinidad, Haiti, Surinam, Brasil y México donde fue responsable de ocho casos hemorrágicos y uno fatal (37). Colombia ha sido el unico país de la región que ha reportado circulación de dengue 3; al parecer durante 1983 este serotipo pudo ser la causa de algunos brotes, sin embargo la evidencia es unicamente serológica pues no se logro aislar al virus (38). Ya fue mencionada anteriormente la epidemia de FHD/SCD de Cuba en 1981 y solo bastaria indicar que fue la primera epidemia de este tipo que se ha reportado en el

continente (39).

En 1977 las autoridades internacionales de salud declararon al dengue como problema de salud pública regional. Por esta razón la información sobre dengue se comenzó a recabar sistemáticamente a partir de este año. De 1975 a 1980, 27 países en el hemisferio reportaron alrededor de 660,000 casos mientras que en 1983 se reportaron tan solo 25,216 lo que sugiere que muchos países subnotificaron el padecimiento (5,6). Así, en 1981 se realizó una encuesta en Surinam, en la que el 10 % de la población tuvo síntomas clínicos compatibles con dengue además de haber encontrado 3 casos de SCD (6) cuando durante ese mismo año ningún caso de dengue fue reportado por las autoridades de salud de ese país; durante la epidemia de dengue en Brasil en 1986 se informaron 47,370 casos, sin embargo, estudios seroepidemiológicos estiman que el número de casos de dengue durante esta epidemia fué de alrededor de 500,000 (5,6,38,40). Por otro lado se sabe que el dengue tiene un amplio número de infecciones asintomáticas y que esta proporción puede llegar hasta el 40 % en la población susceptible en Puerto Rico (6).

En nuestro país los primeros informes sobre el dengue clásico se presentaron en el sureste de México en 1978. A partir de esa fecha los casos reportados han tendido a descender, pero como ya se señaló anteriormente esto se debe a la subnotificación de los casos reales; algunos elementos que permiten afirmar lo anterior son: a) la expansión de la distribución de actividad del virus en casi la totalidad de los Estados de la República; b) la circulación de tres serotipos en el país y c) la aparición de



brotos en regiones que rebasan los 1700 metros sobre el nivel del mar como en los casos de Oaxaca y Puebla de 1985 (40).

En 1983 se notificaron casos por primera vez en las ciudades de Guaymas (Son), Guamuchil (Sin) y Zihuatanejo (Gro). Se detectó además una importante actividad vírica en las ciudades de Tapachula y Tuxtla Gutierrez (Chis), Acapulco (Gro), Mérida (Yuc) y Veracruz (Ver). La vigilancia seroepidemiológica indicó que en 1983 circulaban en el país por lo menos tres serotipos de dengue. Se aisló dengue 4 en el estado de Oaxaca, dengue 2 en Guerrero y dengue 1 en Puebla y Sonora (5). Durante este año se registraron tasas de ataque superiores a 100 por cada 100,000 habitantes en varios estados de la República (5). En 1988 se reportó un brote en la zona urbana de Guadalajara (Jal) donde se presentaron 685 casos con una tasa de ataque de 6.5 por cada 100 habitantes y donde los datos serológicos son compatibles con una infección por dengue 1 (41). En un estudio realizado en la costa del Pacífico durante 1984, en las poblaciones de Santiago Ixcuitla (Nay), Puerto Vallarta (Jal) y Manzanillo (Col) se logró demostrar la circulación de los serotipos 1 y 2 (42); lo mismo se reportó en el estado de Guerrero. Aquí los casos reportados han aumentado desde 1986, en este año fueron 745; para 1987 fue el tercer estado en el que se notificaron más casos (1,939) solo por debajo de Oaxaca (4,305) y Nayarit (2,314); y para septiembre de 1988 que es la información disponible más reciente, en este estado se reportaron 964 casos (43).

La mayoría de los casos reportados en México han sido de dengue clásico; sin embargo, ha habido casos esporádicos de la enfermedad con manifestaciones hemorrágicas (5). En 1986 se

reportaron dos casos en Nuevo León, 6 casos más en 1987 y hasta septiembre de 1988 otros dos en el estado de Morelos (43).

Finalmente es importante señalar que varios investigadores (5,6) coinciden en advertir que las condiciones epidemiológicas del país son muy similares a las que se presentaban en Cuba en 1981 cuando se presentó la epidemia de FHD/SCD, por lo que la vigilancia epidemiológica y el control del vector son elementos de gran importancia en la prevención y control de esta enfermedad.

## MATERIALES Y METODOS

El diseño metodológico se dividió en dos partes; la primera consistió en la recolección de las muestras en la población estudiada, la obtención de los sueros en ese mismo lugar y el empaque en condiciones óptimas para su traslado a el laboratorio en la Cd. de México. La segunda parte consistió en la determinación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra los cuatro serotipos del virus del dengue; previamente se prepararon dos de los cuatro antígenos por no poderse obtener comercialmente. Por otro lado, con las muestras de suero se infectaron cultivos de tejido de mosquito para intentar la recuperación del virus si este estaba en el suero del paciente y su posterior identificación por inmunofluorescencia; en este caso también preparamos previamente los anticuerpos fluoresceinados correspondientes. Finalmente la información recabada fue procesada en una base de datos, para su análisis.

### OBTENCION DE SUEROS

La población de Mochitlán, se encuentra localizada en la región central del Estado de Guerrero a 1000 metros sobre el nivel del mar (44), es de clima subtropical y cuenta con una población de aproximadamente 10,000 habitantes. Según datos de 1986 había 5,034 hombres y 4,872 mujeres. El 14.2 % son menores de 4 años; 28.3 % entre 5 y 14; 38.1 % entre 15 y 44; 12.0 % entre 44 y 64 y mayores de 65 años el 6.2 %. El municipio tenía en 1986 una tasa media anual de crecimiento de 0.73 %. La esperanza de vida para esta población en el mismo periodo fue de 63.2 años para los hombres y 70.2 para las mujeres. La población

económicamente activa se concentra básicamente en dos actividades; 64.7 % en las labores del campo y 15.4 % en servicios comunales. El 70.1 % de las viviendas tienen pisos de tierra; 25.2 % carecen de agua entubada; 83 % carecen de drenaje y 69.2 % son casas de una sola habitación. El índice de bienestar del municipio calculado con base en información de 1980 era de 18.612 muy inferior al índice nacional que fue de 34.511 (45).

El muestreo se realizó al azar y se tomaron 5 ml de sangre de aquellas personas que presentaban un cuadro sugestivo de dengue. Los sueros se procesaron en el Centro de Salud (CS) del lugar, se guardaron inmediatamente en hielo seco y se transportaron al laboratorio donde se almacenaron a - 70°C hasta su utilización. Conjuntamente con la toma de la muestra de suero, se llenó un cuestionario por cada individuo en el que se solicitaron datos personales y clínicos que se consideraron importantes para el estudio. En la toma de muestras y aplicación del cuestionario participó el personal médico del Centro de Salud del lugar pasantes de la carrera de Químico Biólogo Parasitólogo de la Escuela de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

#### VIRUS

Los virus utilizados como referencia fueron los siguientes: Dengue 1 cepa Hawaii, Dengue 2 cepa Nueva Guinea C, Dengue 3 cepa H87 y Dengue 4 cepa Filipinas H241. Estos virus nos fueron proporcionados por los laboratorios San Juan, Puerto Rico (LDC). Todos fueron cultivados en cerebro de ratón lactante y luego subcultivados en células TRA 284. Las células de mosquito

infectadas con el virus de referencia presentaron aproximadamente el 100 % de células infectadas a los 5 días de infección con una dilución 1:100 de la suspensión original.

#### OBTENCION DE ANTIGENOS PARA INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

En el presente estudio se utilizaron los antígenos comerciales para IH de Dengue 1 (Hawaii) y Dengue 3 (H87), los cuales antes de usarse se rehidrataron con agua destilada toda una noche a 4 °C. Por el método descrito a continuación se prepararon los antígenos de Dengue 2 (NGC) y Dengue 4 (H241).

La obtención de antígenos se llevó a cabo según la técnica descrita por los Laboratorios San Juan, PR. (CDC) (46), para lo cual se inocularon ratones lactantes (de 1 a 2 días de nacidos) intracerebralmente con 0.02 ml del antígeno diluido el cual consistió de una suspensión de tejido cerebral de ratón infectado y mantenido en 30 % de suero bovino en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 (ver apéndice para las formulaciones y preparación de todos los reactivos y medios de cultivo que aparecen en este trabajo). Los ratones se examinaron diariamente hasta la aparición de los signos de la enfermedad que consiste en parálisis de los miembros posteriores, falta de coordinación muscular, temblor generalizado, etc. Cuando la mayoría de los ratones presentaron estos signos y se encontraban moribundos fueron sacrificados.

Antes de obtener el tejido cerebral los ratones se desinfectaron con alcohol al 70 %. Los cerebros se obtuvieron asepticamente por medio de succión con jeringa de 20 ml y aguja del número 18. El tejido así obtenido fue vertido a un recipiente estéril y se almacenó a -70°C hasta que se tuvo la cantidad

conveniente para preparar el antígeno.

El antígeno se preparó en una campana de seguridad biológica y todo el material que se utilizó y las áreas de trabajo fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % antes y después de ser utilizadas. El tejido cerebral se transfirió a un mortero estéril y se agregó 4 volúmenes de solución acuosa de sacarosa al 8.5 % y se homogeneizó completamente. El homogeneado se vertió lentamente (mas o menos 1 ml de homogeneado por minuto) en 20 volúmenes de acetona fría contenida en una botella de centrifuga de 250 ml con agitación continua. Cuando se terminó de agregar se mantuvo en baño de hielo por 1 h. Pasado este tiempo se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se retiró por succión, y el líquido se recibió en un matraz que contenía una solución de hipoclorito de sodio. El precipitado se resuspendió en 180 ml de acetona fría con ayuda de un agitador de vidrio. Se dejó reposar por 2 h. y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó por medio de vacío. Es muy importante que el secado sea rápido y completo pues en nuestra experiencia de no hacerse así, disminuye considerablemente el título de hemaglutinación del antígeno. Después del secado se agregó una solución de borato salino pH 9 (BS) en un volumen de 0.4 más del volumen original del tejido. Esta suspensión se dejó hidratando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugo a 10,000 rpm durante 1 h a 4 C. Se obtuvo el sobrenadante y se descartó el botón. Se midió el volumen del sobrenadante y se agregó Tris 1 M (en NaCl al 0.85 %) de tal forma que la

concentración final de Tris fuera 0.1 M.

Los antígenos se prueban en un ensayo de hemaglutinación para determinar su título hemaglutinante con eritrocitos de ganso (GRBC). La hemaglutinación con el virus del dengue es dependiente del pH y por ello se tuvo que determinar el pH óptimo para el ensayo, el cual se realizó de la siguiente manera: a una placa de microtitulación para hemaglutinación se agregaron 0.05 ml de solución de albúmina bovina al 0.4 % en BS por pozo y se hicieron diluciones sucesivas del antígeno. A todos los pozos se les agregó 0.05 ml de GRBC a una dilución 1:24 en el amortiguador con pH de 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, y 7.0 respectivamente. La placa se dejó incubar por 1 h y se determinó el título hemaglutinante, el cual es la dilución máxima del antígeno que es capaz de aglutinar los eritrocitos de ganso a un pH determinado y se expresa como una Unidad Hemaglutinante (UH).

#### PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IH).

Para realizar la prueba de IH los sueros se trataron previamente según la técnica descrita por el CDC (46). Los sueros se incubaron por 30 min con 4 volúmenes de BS y 5 volúmenes de una suspensión de kaolin al 25 % en BS, la suspensión se agitó suavemente cada 10 min, se centrifugaron a 3,000 rpm por 30 min, se obtuvo el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio, se agregó una gota (aproximadamente 0.05 ml) de paquete celular de GRBC y se incubó en baño de hielo por 20 min; luego se centrifugó a 1,000 rpm por 10 min y se obtuvo el sobrenadante. El suero así tratado está ya a la dilución 1:10 y exento de hemaglutininas inespecíficas. Los sueros se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para llevar a cabo la IH se incubó el suero con una cantidad constante de antígeno; esta cantidad expresada en unidades hemaglutinantes (UH).

El ensayo de IH se describe a continuación: en una placa de microtitulación para hemaglutinación se hicieron diluciones sucesivas de 0.025 ml del suero en solución de albúmina bovina al 0.4 % en BS (BABS). A todos los pozos se les agregó 0.025 ml de antígeno en BABS que tuviera 8 UH en 0.05 ml. Se incubó toda la noche a 4°C y se agregó 0.05 ml de dilución 1:24 de GRBC al 8 % (GRBC 1:24) en el pH óptimo de hemaglutinación. Por otro lado se hicieron los siguientes controles: se verificó el título de el antígeno para confirmar la cantidad de hemaglutinina haciendo diluciones seriadas de 0.05 ml del antígeno en BABS e incubando con 0.05 ml de una suspensión de GRBC 1:24; así mismo, se hizo un control de células incubando 0.05 ml de suspensión de GRBC 1:24 con 0.05 ml de BABS. Los sueros y controles incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se hizo la lectura de hemaglutinación.

#### AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LOS SUEROS DE LOS PACIENTES.

Los sueros se descongelaron y se mantuvieron en baño de hielo con el fin de evitar la inactivación del virus (47). Cada suero se esterilizó pasándolo por un filtro estéril de nitrocelulosa de 0.45 micras. Con 0.05 ml de éste filtrado se inocularon tubos de cultivo con cultivo de células de mosquito TRA 284 semiconfluentes de los que previamente se les retiró 1 ml de medio de cultivo. El virus se dejó adsorber durante 1 h a 28°C, después se añadió 1 ml de medio TPB-L 15 con 1 % de suero



fetál bovino (ver apéndice). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante dos semanas. Se incluyeron controles infectados con las cepas de dengue de referencia y cultivos sin infectar.

#### LÍNEA DE CELULAS UTILIZADA

La línea de células utilizada en el presente estudio fue la TRA 284 SFG que originalmente fue aislada y caracterizada por el Dr. Goro Kuno de los laboratorios San Juan, P.R. (CDC) (48). Esta línea de origen epitelial del mosquito no hematófago Toxorhynchites amboinensis crece en medio de cultivo libre de suero en ausencia de CO<sub>2</sub> y a 28°C. Se cultivan en el medio TPR-L 15.

#### DETECCION DEL VIRUS POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

La detección del virus en las células infectadas se realizó por la técnica de inmunofluorescencia directa (ID). Las células infectadas se fijaron en un portaobjetos escavado (Cell-Line Assoc. Minolta, N.J. USA) se incubaron con anticuerpos anti-Flavivirus conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Conjugado Directo) y la observación se hizo en un microscopio de epifluorescencia, para esto se procedió así:

Los cultivos positivos se procesaron para el aislamiento del virus por lo que las células se desprenden suavemente del tubo; se centrifugaron por 10 min a 1,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en PBS; se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y las células se resuspendieron en una décima parte del volumen original (aproximadamente 0.3 ml) con PBS. Se depositó una gota de la suspensión celular sobre un portaobjetos escavado. Los portaobjetos se dejaron secar al aire por 1 hr y se fijaron en

acetona fría por 10 min. Se sacaron y se deja evaporar el exceso de acetona. Se añadió una gota del conjugado directo y se incubó por 30 min en cámara húmeda a 37°C. Los portaobjetos se lavaron con PBS con ligera agitación por 10 min y se colocó un cubreobjeto con glicerol-PBS evitando dejar burbujas entre porta y cubreobjetos y se observó al microscópio de fluorescencia. Los sueros que dieron resultados positivos se conservaron a -70°C con 30 % de SFB, los que fueron dudosos se reinocularon en otro tubo y los que fueron negativos se descartaron.

El conjugado utilizado (47) fue una mezcla de sueros humanos con altos títulos de IH (mayores o iguales a 1280) para dengue; en algunos ensayos preliminares también se utilizó el anticuerpo monoclonal 2H2 que reconoce determinantes antigenicos de complejo de dengue (49).

A continuación se describe la obtención del anticuerpo monoclonal 2H2, producido por el hibridoma HB 114, y la conjugación con isotiocianato de fluoresceína: se obtuvo ascitis de ratones (HMAF) a los que previamente se les había inoculado por vía intraperitoneal  $1 \times 10^7$  células del hibridoma HB 114; se precipitaron las gamma globulinas con una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , se dializaron contra PBS y se determinó la concentración total de proteína, se ajustó la concentración de proteína a 10 mg/ml y se incubó en baño de hielo por 10 min en amortiguador de carbonato-bicarbonato (0.5 M pH 9) y se agregaron 0.0125 mg de FITC/mg de proteína; se incubó protegido de la luz durante 12-18 h y se dializó con PBS. Para eliminar la fluorescencia inespecífica, el conjugado se absorbió con polvo de

hígado desengrasado de ratón. La potencia del conjugado se determinó por dilución del conjugado en laminillas de células infectadas, la dilución donde todavía se apreciaran células fluorescentes en forma de anillo sería la dilución de trabajo.

#### IDENTIFICACION DEL SEROTIPO DE LOS VIRUS AISLADOS.

Con el fin de identificar el serotipo de los cultivos que resultaron positivos por la anterior técnica; los cultivos de células fueron incubados con el anticuerpo monoclonal específico de serotipo (preparado en ratón) y se reveló con un anticuerpo anti-gamma globulina de ratón marcado con FITC (conjugado indirecto). La observación se realiza en un microscopio de epifluorescencia.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en esta prueba son los originalmente preparados por Henchal y colaboradores (49) y proporcionados por el CDC (Atlanta GO.USA).

La potencia de los anticuerpos monoclonales se probó de la misma manera que para el conjugado directo y agregando la misma cantidad de conjugado indirecto (1 gota de dilución 1:75). El conjugado directo se tituló de forma similar agregando la misma cantidad de anticuerpo monoclonal.

#### CARACTERISTICAS DE LOS Ac<sub>m</sub> UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION

| Antígeno | Monoclonal | Tipo de Ig        | Det. Antigen | Neut | IH  | Fac |
|----------|------------|-------------------|--------------|------|-----|-----|
| DEN-1    | 15F3       | IgG <sup>1</sup>  | TIPO         | -    | -   | -   |
| DEN-2    | 3H5        | IgG <sup>1</sup>  | TIPO         | SI   | +/- | NO  |
| DEN-3    | 5D4        | IgG <sup>1</sup>  | TIPO         | -    | -   | -   |
| DEN-4    | 1H10       | IgG <sup>1</sup>  | TIPO         | -    | -   | -   |
| DEN-2    | 2H2        | IgG <sup>2a</sup> | COMPLEJO     | NO   | NO  | SI  |

Antígeno = Antígeno con el que se inmunizó  
Monoclonal = Identificación de la clona probada  
Tipo de Ig = Tipo de inmunoglobulina del monoclonal  
Det. Antigen = Tipo de determinante antigénico  
Neut = Actividad Neutralizante  
IH = Actividad Inhibidora de la Hemaglutinación  
Fac = Actividad Facilitadora

## R E S U L T A D O S

### POBLACION ENCUESTADA.

La Tabla I muestra la distribución en función de la edad y el sexo de los individuos encuestados; solo tres individuos no declararon su edad por lo que estos no son tomados en cuenta en los totales cuando se refiere a edad, pero sí respecto a sexo. Por otro lado el sujeto de menor edad tenía 7 años y el de mayor edad 77 años. Declararon haber padecido dengue 67 (48.5 %) personas; no haber padecido 53 (38.4 %) y que lo ignoraban 18 (13.0 %). Presentaron fiebre durante las 24 h anteriores a la toma de muestra 125 (90.6 %) personas y no presentaron fiebre antes de la toma de muestra 13 (9.4 %). Es importante señalar que 6 (4.3 %) personas no declararon haber padecido fiebre, ni tuvieron dengue antes de la toma de muestra.

### INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

En la Figura 1 se muestra la reactividad de las muestras frente a por lo menos uno de los cuatro antígenos probados de dengue; esto es, se considero un suero positivo aquel que por lo menos en un antígeno tuviera un título igual o mayor a 1:20, este título es el generalmente aceptado para la prueba IH (46).

Con el fin de observar tendencias en la respuesta por antígenos, la Figura 2 muestra la distribución porcentual por título de IH y antígeno probado. Solo se presentaron 10 casos en que la respuesta por IH fué solo para un antígeno; uno para Den-2 y nueve para Den-4.

La reactividad por grupo de edad se muestra en la Figura 3. La Figura 4 muestra la reactividad en función del sexo. Es

pertinente mencionar que los días en que se tomaron las muestras fueron días hábiles; por ello, en los domicilios se encontraron mas niños y mujeres que hombres. Por otro lado, la mayoría de los sujetos que trabajan acuden a sus actividades aun cuando esten enfermos.

#### SIGNOS Y SINTOMAS EN LA POBLACION ENCUESTADA

Los signos y síntomas más frecuentes encontrados entre la población encuestada se presentan en la Tabla II. En el cuadro se incluyen los signos y síntomas que con mayor frecuencia se pueden encontrar en el llamado dengue clásico, aunque no solamente en este. Ya que no se pudo realizar pruebas de laboratorio que fueran concluyentes, las respuestas a ciertas preguntas son ambiguas en tanto que pueden ser contradictorias o parciales.

#### AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL DENGUE

Se logró aislar el virus de 25 muestras (18.1 %) pero solo de 16 (11.6 %) se logró identificar el serotipo, en todos los casos fue DEN-4. La Tabla III muestra los datos más importantes de los pacientes a los que se les aisló el virus.

En los sueros que se pudo identificar el serotipo, 14 (87.5 %) presentaron fiebre y 2 (12.5 %) no; 7 (43.8 %) declararon haber padecido dengue antes de la toma de muestra y 9 (56.2 %) declararon no haberlo padecido. De aquellos a los que no se logró determinar el serotipo, 7 tenían fiebre y 2 no; 4 declararon haber padecido dengue, 3 declararon no haberlo padecido y 2 no sabian si lo habian padecido. Es interesante que de los 16 individuos a los que se les aisló e identificó el serotipo 4, 2 (12.5 %) ni presentaron fiebre, ni declararon haber padecido dengue antes.

La Figura 5 muestra la distribución de identificados y no identificados por grupo de edad.

## D I S C U S I O N

La prueba de detección de anticuerpos contra el virus del dengue por inhibición de la hemaglutinación (IH) muestra un alto porcentaje de sueros positivos (Fig.1). Esto sugiere que la población estudiada ha estado en contacto con el virus; y dado que casi el 50 % (Fig.2) de las muestras presentan títulos mayores o iguales a 1:1280 se puede suponer que el contacto con el virus es frecuente; esto es, que la población se encuentra en una zona donde la infección se presenta en forma endémica. Esta observación es, en cierto sentido, inédita pues los reportes de casos de dengue en el estado de Guerrero mencionan primordialmente a las regiones de la Costa Grande y Costa Chica y a la región de Tierra Caliente como zonas endémicas (50). Es posible que esto sea reflejo de la subnotificación de casos que de la introducción reciente de la enfermedad a esa zona, ya que la respuesta a los cuatro serotipos es muy alta, el 37% tiene títulos mayores o iguales a 1:1280 para los cuatro serotipos y se ha observado que en zonas endémicas la respuesta de anticuerpos IH es semejante (4,51), con lo que la posibilidad de que esta población haya tenido un primer contacto con el virus es muy baja.

El título de anticuerpos en el suero frente a los antígenos probados fue muy heterogéneo (Fig.2). No se observa alguna tendencia significativa que favorezca a alguno de los serotipos; sin embargo, se obtuvieron 9 muestras en las que la reacción fue solamente positiva para el antígeno de dengue 4, esto sugiere que esos pacientes sufrieron una infección por este serotipo. De



estos sueros se logró aislar e identificar al serotipo 4 en 2 muestras (Tabla III)

Aunque no se pudo obtener una segunda muestra de suero, se puede concluir que dada la alta heterogeneidad de la respuesta por IH y la magnitud de la misma, la mayoría de los casos mostraron una respuesta secundaria heterotípica (46).

No se encontraron evidencias por IH de que algún grupo de edad o sexo fuera más afectado (Fig.3 y Fig.4). El hecho de que no se encuentren sueros en los grupos de edad de 45 a 64 años y mayores de 64 no es significativo, debido a que la cantidad de muestras de esos grupos es relativamente pequeña. En otros reportes se ha sugerido que la población más afectada es la de jóvenes adultos y mujeres (1,28,29). Aunque es todavía materia de discusión parece que por lo menos en el caso de la incidencia en mujeres, esta propensión es reflejo de que el vector tiene hábitos urbanos por lo que en las zonas donde la actividad principal es la agrícola -y esta la ejecutan los hombres- las mujeres, por permanecer en sus hogares, tendrían mayor probabilidad de ser picadas por el mosquito y de esta forma infectarse. Parece ser esta la razón de la alta prevalencia de anticuerpos en mujeres detectados en este estudio (28). También es posible que no se observen diferencias pues, en la mayoría de los casos los títulos por IH son bastante altos y, por otro lado, que no se puede saber si todas las muestras provenían de sujetos realmente enfermos.

Los signos y síntomas que se reportan en este trabajo son similares a los que generalmente se encuentran en otras zonas

endémicas de dengue (4,51). Es importante señalar que un signo hemorrágico como las petequias se encontro en el 37 % de los casos. Este hecho es cualitativamente sobresaliente ya que las manifestaciones severas de la enfermedad se asocian con manifestaciones hemorrágicas principalmente en infecciones secundarias heterologas (1,20). Por las limitaciones de este estudio, no se pudo tener información clínica y de laboratorio adicional, que pudiera aportar más datos al respecto; sin embargo el hecho de encontrar manifestaciones hemorrágicas (las petequias) en un brote de dengue clásico, alerta sobre la posibilidad de encontrar más frecuentemente este tipo de manifestaciones en esta región.

De un total de 25 muestras de las cuales se logro aislar el virus, solo se pudo identificar al serotipo 4 en 16 muestras. Es posible que en estas nueve muestras se haya perdido al virus durante el procesamiento para la identificación; probablemente se encontraba en muy baja concentración y al descongelarse la muestra para identificación el poco virus que hubiera se habria inactivado; este virus es muy lábil a la temperatura (13). La eficiencia de aislamiento fue baja (18.1 %) a pesar de que un criterio clínico de inclusión importante fue la fiebre; no obstante hubo por lo menos tres casos en los que se aisló al virus y los pacientes declararon no haber tenido fiebre ni haber padecido dengue con anterioridad (Tabla III).

Resulta interesante confrontar los datos de aislamiento viral con la respuesta de anticuerpos por IH; como se observa en la Tabla III, los títulos por IH de los sueros a los que se les aisló el virus, son muy heterogéneos; se encuentran desde sueros

negativos por IH (5 de 25) hasta sueros con títulos mayores o iguales a 1:1280 para los cuatro serotipos. Estos últimos son particularmente interesantes y señalan que a pesar de presentar títulos altos de anticuerpos contra el virus esto no parecen tener un efecto neutralizante significativo, lo que explicaría que lográramos aislar al virus en cultivo de células aún en presencia de títulos altos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación. Por otro lado, como se puede observar, los títulos de anticuerpos por IH cuando se prueba con antígeno de dengue 4 tienden a ser mayores que para los otros serotipos (Tabla III); vale la pena señalar que cuando se tienen títulos altos con el antígeno de dengue 4 también se observan con antígeno de serotipo 2, lo cual pudiera explicar, en parte, que exista cierta relación antigénica entre estos dos serotipos (52).

La Figura 5 muestra que el grupo de edad donde se realizaron más aislamientos fue el de 15 a 44 años; esto correlaciona muy bien con otras observaciones (43,51); es cierto que son muy pocas muestras; sin embargo, resulta ilustrativo de que cuando se toman en cuenta solo los casos comprobados la distribución tiende a ordenarse de otra forma. Cuando se comparo aislamiento con sexo del paciente se encontró que no había ninguna diferencia por lo que no se muestran los resultados.

Quizá el hallazgo más sobresaliente encontrado en este estudio, es el hecho de haber aislado al serotipo 4 en esta región ; ya que hasta ahora no se había reportado circulación de este serotipo en el estado de Guerrero; los estudios realizados con anterioridad aportan evidencias de la circulación

de serotipo 1 y serotipo 2 (53); en un estudio bastante completo realizado en 1987 por Gomez Dantes y colaboradores (42) se obtuvieron muestras de tres localidades ubicadas en la costa del pacífico ( de Nayarit a Colima ) solo se encontró evidencia de actividad de dengue 1 y dengue 2 . Por otro lado, el único brote de dengue hemorrágico que se halla documentado y del cual se tienen evidencias de casos fatales asociados con FHD/SCD ocurrido en México (Mérida, Yuc. 1984 ref. 54) fue causado por el serotipo 4.

Como es sabido, uno de los factores que puede favorecer la aparición de casos severos de la enfermedad es la secuencia de infección por dos serotipos distintos (1); así, se sabe que la secuencia del serotipo 1 y 2 como sucedió en el caso de Cuba (26) o la secuencia de los serotipos 1 y 3 como ocurre en el sureste asiático (9) han provocado las epidemias más graves de dengue hemorrágico y son una causa importante de mortalidad. Dado estos antecedentes, el riesgo de que se puedan presentar brotes hemorrágicos en edo. de Guerrero aumenta considerablemente con la circulación del serotipo 4 demostrada en este trabajo.

Otro aspecto interesante es que aunque el serotipo responsable del brote hemorrágico en Yucatán fue el 4 no se puede asegurar que sea el mismo que se aisló en el estudio; ello es relevante pues es posible que entre diferentes cepas del mismo serotipo varíe la virulencia o la patogenicidad (24). Aquí cabría hacer una reflexión sobre la importancia de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad a la luz de estos resultados. Si bien es cierto que los sistemas de vigilancia del Sector Salud generan bastante información sobre el estado epidemiológico de la

enfermedad, parece evidente que esto no es suficiente. De 1987 a la fecha no se ha reportado oficialmente actividad de el serotipo 4 en Guerrero; sin embargo ya se tenía información de la presencia de dengue 4 en Oaxaca (50) y Morelos (55), estos estados tienen un alto intercambio migratorio y comercial con Guerrero (45), por lo que era de esperarse la introducción de de el serotipo 4 al Edo. de Guerrero. Por otro lado, habría que remarcar la subnotificación de casos, pues como lo demuestran los resultados por IH, sí el 90 % de la población de la comunidad ha tenido contacto con el virus del dengue y la comunidad tiene una población de casi 10,000 habitantes, no se explica como de 1986 a 1988 sólo se han reportado aproximadamente 3,000 casos en todo el estado de Guerrero (43).

Un aspecto importante que no fué abordado en el estudio, pero que al realizarlo se comprendió la urgente necesidad de abordarlo, es el estudio de el vector. La influencia de la densidad del mosquito en la dinámica de los brotes además de la eficiencia de transmisión de la enfermedad, son elementos que darían mucha información para el control de la enfermedad. En opinión del Dr. Scott Halstead (comunicación personal), el control del vector parece ser el punto crítico en la prevención de la enfermedad, dados los problemas que ha tenido la generación de vacunas eficientes para dengue.

A partir de los hallazgos realizados en el presente trabajo sería muy interesante comparar las cepas del serotipo 4 que circulan en México mediante el uso de técnicas inmunológicas y de biología molecular. Esta información puede contribuir al

mantenimiento de una red de vigilancia epidemiológica y prevención de brotes hemorrágicos. También sería valioso tener técnicas diagnósticas más rápidas, sensibles, específicas y sencillas, pues es un hecho que sin una técnica adecuada de diagnóstico, la capacidad de respuesta ante un brote es bastante pobre.

El problema del dengue en México requiere de un esfuerzo en la vigilancia epidemiológica, y estudios como este aportan información a las dependencias del Sector Salud.

Hay necesidad de que profesionales del área se entrenen en el diagnóstico de esta enfermedad, en el control del vector y en estudios epidemiológicos. En síntesis, el dengue es un problema de salud pública al cual no se le ha dado la importancia que su compleja biología requiere.

## CONCLUSIONES

a).- En relación a la prevalencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el virus del dengue, se encontró:

1.- La comunidad estudiada se encuentra en una zona donde la enfermedad se presenta en forma endémica.

2.- La mayoría de los casos presentan una respuesta de tipo secundario y heterotípico, con lo que la posibilidad de desarrollo de manifestaciones severas de la enfermedad aumenta.

3.- Queda demostrado, dada la alta prevalencia de anticuerpos IH, la subnotificación de los casos de dengue reportados en este estado.

b).- En relación a la variedad de serotipos circulantes en la comunidad, se demuestra:

1.- La circulación del serotipo 4. Este serotipo no se había aislado en la región anteriormente.

2.- Adicionalmente se encontró que, aunque el cuadro clínico corresponde al de dengue clásico, en una proporción importante de casos se presentan manifestaciones hemorrágicas leves como petequias.

## REFERENCIAS

- 1.- Halstead S.B. "Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology". Science January, vol. 239, 476-481 (1988).
- 2.- Halstead S.B. "Selective primary health care: Strategies for control of disease in developing world XI. Dengue". Rev. Infect. Dis. 6: 251-264 (1984).
- 3.- Brown A.W.A. "World geography of human disease". G.W. Howe editor, Academic Press, London U.K. 1977, pp. 271-317.
- 4.- Kaplan J.E., et-al. "Epidemiologic investigations of dengue infection in Mexico, 1980". Am. J. Epidemiol. 117: 335-343 (1983).
- 5.- Ramos C. "Biología de la infección causada por el virus de dengue". Sal. Publ. Mex. 31:1 54-72 (1989).
- 6.- Gomez Dantes H. "Epidemiología del Dengue". Monografía Inst. Nac. Sal. Publ. 1988.
- 7.- Kumate J. Gutierrez G. Manual de infectología. 11 ed. Ed. Mendez Cervantes, Mexico D.F. 1985 pp 454-463.
- 8.- World Health Organization. "Guide for diagnosis, treatment and control of dengue hemorrhagic fever". 2nd. Ed. Manila Fil.: WHO 1980.
- 9.- Sangkawibha N., et-al. "Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong". Am. J. Epidemiol. 120:653-669 (1984).
- 10.- Westaway E.G., et-al. "Flaviviridae". Intervirology. 24:183-192 (1985).
- 11.- Dubois-Dalco M., et-al Editors. "Assamby of enveloped RNA viruses". Viena Aust. Springer-Verlag 1984: 136-147.



- 12.- Smith G.W., Wright P.J. "Synthesis of protein and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and Aedes albopictus cells". J. Gen. Virol. 66:559-571 (1985).
- 13.- Schlessinger R.W. Ed. "The Togaviruses: Biology, Structure, Replication". N.Y. USA. Academic Press.1980.
- 14.- "Monografia del Dengue".Oficina Panamericana de Salud. 1980.
- 15.- Daughaday C.C., et-al. "Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes : trypsin-sensitive virus receptors and trypsin resistant immune complex receptors". Infect. Immun. 32:469-473 (1981).
- 16.- Bhamarapravati N. "Pathology and patogenesis of DHF". Hotta S. Editor. Dengue Hemorrhagic Fever. Kobe Jap. International Center for Medical Research, Kobe University School of Medicine kobe. 1981, 207-214.
- 17.- Boonpucknavig S., et-al. "Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever". Am. J. Pathol. 85:37-47 (1976).
- 18.- Halstead S.B. "In vivo enhancement of dengue virus infection in Rhesus monkeys by passively transferred antibody". J. Infect. Dis. 140:527-533 (1979).
- 19.- Lam K.W., et-al. "Characterization of serum acid phosphatase associated with dengue hemorrhagic fever". Clin. Chem. 28:2296-2299 (1982).
- 20.- Sumarmo W.H. "Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia". Bull. PAHO. 61:693-701 (1983).
- 21.- Winton J., et-al. "Fatal hemorrhagic disease and shock

associated with primary dengue infection on a Pacific Island".  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:495-506 (1974).

22.- Halstead S.B. "The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infection disease". Am. J. Epidemiol. 5:636-648 (1981).

23.- Holland J., et-al. "Rapid evolution of RNA genomes".  
Science. 215:157-158 (1982).

24.- Monath T.P., et-al. "Geographic classification of dengue 2 virus strains by antigen signature analysis". Virology. 154:313-318 (1986).

25.- Henchal E.A., et-al. "Identification of an antigenic and genetic variant of dengue 4 virus from the caribbean". Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:393-405 (1986).

26.- Guzman M.G., et-al. "Casos mortales de dengue hemorragico en Cuba, 1981". Bull. OPS. 97:111-117 (1984).

27.- Halstead S.B., et-al. "Immunological enhancement of dengue virus replication". Nature New Biol. 243:24-25 (1974).

28.- Cantelar N. "Circulacion de dengue en Cuba (1978-1979)".  
Rev. Cub. Med. Trop. 33:72-78 (1981).

29.- Gubler D.J. "Factors influenciig the distribution and spread of epidemic dengue hemorrhagic fever". Asian J. Infec. Dis. 2:128-140 (1978).

30.- Kourt G., et-al. "Why dengue hemorrhagic fever in Cuba ? II: An integral analisis". (En prensa).

31.- Khin M.N., THAN K.A. "Transovarial transmission of dengue 2 virus by Aedes aegypti in nature". Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:590-594 (1983).

32.- Centers for Disease Control. "Update! Aedes Albopictus

infestation: United States". Morbidity and Mortality Weekly Report. 35:649-651 (1986).

33.- Fukunaga T., et-al. "Seroepidemiological study of arbovirus infections in the north-east and south of Thailand". Biken J. 17:169-182 (1974).

34.- Cantelar N. "Dengue en el Caribe y las Americas". Rev. Cub. Med. Trop. 35:136-145 (1983).

35.- Ehrenkranz N.J., et-al. "Dengue in Caribbean countries and the southern United States. Past, present, and potential problems". New Engl. J. of Med. 28:1460-1469 (1971).

36.- Bres P. "Historical review of dengue II: Implications of its introduction in the western hemisphere in 1977". Dengue in the Caribbean 1977. Washington D.C. USA. OPS (Publicacion Cientifica 375) 1979: 4-10.

37.- "El dengue en las Americas 1983". Bol. Epidemiol. OPS. 5:1-3 (1984).

38.- Schatzmeyer A.G., et-al. "An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81:245-246 (1986).

39.- Guzman M.G., et-al. "Casos mortales de dengue hemorragico en Cuba. 1981". Bol. of Sanit. Panam. 97:11-117 (1984).

40.- Ramos C. "Casos de dengue en las Americas 1986-1987". Infectologia. 7:333-341 (1988).

41.- Vazquez Castellanos J.L., et-al. "Dengue en Guadalajara: Estudio Epidemiologico de un brote ocurrido durante el mes de septiembre y octubre de 1988". Epidemiologia. 4:7-8 (1989).

42.- Gomez Dantes H., et-al. "Epidemias de Dengue en la costa del Pacifico Mexico 1984". Epidemiologia. 2:1-3 (1986).

- 43.- Reporte anual de enfermedades infecciosas 1985-1988. Epidemiologia. Direccion general de epidemiologia. Secretaria de Salud. Mexico, D.F.
- 44.- Anuario Estadistico del Estado de Guerrero 1988. Instituto Nacional de Geografia e Informatica. Secretaria de Programacion y Presupuesto. Mexico D.F.
- 45.- Cuaderno de informacion para la planeacion: Guerrero. Instituto Nacional de Geografia e Informatica. Secretaria de Programacion y Presupuesto. Mexico, D.F.
- 46.- "Serological procedures". Dengue Laboratory Diagnostic Procedures. Chap.9. San Juan Laboratories, Centers for Disease Control, U.S. Public Health Service, San Juan, Puerto Rico. 1981: 81-129.
- 47.- "Dengue virus Isolation And identification using Mosquitoes, LLC-MK2 cells and the fluorescent focus inhibition test". Dengue Laboratory Diagnostic Procedures. Chap.7. Institute Pasteur, Cayenne, French Guiana. 1981:59-67.
- 48.- Kuno G. "Dengue replication in a polyploid mosquito cell culture grown in a serum free medium". J. Clin. Microbiol. 6:851-854 (1982).
- 49.- Henchal E.A., et-al. "Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue 2 virions using monoclonal antibodies". Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:162-167 (1985).
- 50.- Estadisticas vitales. Gobierno del Estado de Guerrero 1987.
- 51.- Carrada Bravo T., et-al. "Ecologia del dengue y el Aedes aegypti. Investigacion preliminar". Sal. Pub. Mex. 26:63-74 (1984).
- 52.- Blok J. "Genetic relationships of the dengue viruses

serotypes". J. Gen. Virol. 66:1323-1327 (1985).

53.- Zarate Aquino M.A. "Epidemiologia del dengue". 50 aniversario del Instituto de Enfermedades Tropicales. Mexico D.F. 1989.

54.- Lorono Pino M.A., et-al. "Report from the departamento de patologia tropical, Centro de investigaciones regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Arthropod-Borne virus information exchange. CDC. 1987: 120.

55.- Ramos C., Alvarado A. Datos no publicados.

## A P E N D I C E

### PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

#### - SOLUCION DE SACAROSA AL 8.5 %

sacarosa q.p..... 8.5 g

Agua dd..... 100 ml

Se disuelve la Sacarosa y si es necesario se filtra y esteriliza en autoclave a 10 lbs por 10 min.

#### - SOLUCION DE BORATO SALINO pH 9

Acido bórico 0.5 M ..... 100 ml

NaCl 1.5 M ..... 80 ml

NaOH 1 N ..... 24 ml

Agua dd q.b.p. .... 1000 ml

El ácido se disuelve en la mitad del volumen que se va a preparar y se calienta ligeramente hasta disolución total. Se enfría a temperatura ambiente y se afora a la marca. Después de mezclar las soluciones y determinar el pH. Ajustar si es necesario.

#### - AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS pH 7.4, 0.01 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Anh)..... 1.24 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ..... 0.18 g

NaCl ..... 8.5 g

Agua dd..... 1000 ml

Disolver los componentes y ajustar el pH en caso necesario con NaOH 1N o HCl 1N. Esterilizar en autoclave por 10 min a 10 lbs de presión.

- SUSPENSION DE ERITROCITOS DE GANSO

A un ganso macho adulto se le extrae asepticamente por punción venosa aproximadamente 10 ml de sangre, la cual se mezcla con 30 ml de anticoagulante de Alsever. Se obtiene el paquete celular centrifugando a 1,000 rpm por 10 min. El plasma se descarta y el paquete se lava tres veces con solución de dextrosa gelatina veronal (DGV). Se completa el volumen original con DGV y se almacena por lo menos una semana a 4 C antes de usarse. De esta suspensión se preparan volumen a volumen soluciones al 50 % y 8 % para los diferentes ensayos.

- ANTICOAGULANTE DE ALSEVER

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| dextrosa .....        | 20.5 g  |
| NaCl.....             | 4.2 g   |
| Acido citrico.....    | 0.55 g  |
| citrato de sodio .... | 8.0 g   |
| Agua dd.....          | 1000 ml |

Disolver y esterilizar en autoclave 15 min a 10 lb de presion.

- SOLUCION DGV

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| dextrosa .....             | 10.0 g  |
| Acido barbitúrico .....    | 0.58 g  |
| barbiturato de sodio ..... | 0.38 g  |
| gelatina .....             | 0.68 g  |
| CaCl2 (Anh) .....          | 0.02 g  |
| MgSO4.7H2O .....           | 0.12 g  |
| NaCl .....                 | 8.5 g   |
| Agua dd .....              | 1000 ml |

El ácido barbitúrico y la gelatina se disuelven aparte de los demás, en un cuarto del volumen que se desee preparar. Para lograr su disolución se calienta hasta disolverlos completamente, se deja enfriar a temperatura ambiente y se mezclan con los demás componentes. Se esteriliza en las condiciones estándar. Después que se haya enfriado se chequea el pH que deberá ser de 7.0 a 7.6 en caso contrario descartar la solución y prepararla de nuevo.

- SOLUCION DE ALBUMINA BOVINA AL 0.4 % EN BS

Solución madre de albumina bovina ..... 100 ml  
 BS ..... 900 ml

No es necesario esterilizar. No se debe utilizar después de una semana.

- SOLUCION MADRE DE ALBUMINA BOVINA

albumina bovina (Fraccion V de Conn).... 4.0 g  
 BS ..... 190 ml

Se esteriliza por filtración en Millipore de 0.2 micras. La solución es estable por lo menos tres meses.

- SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA DILUCION DE GRBC

Para preparar 100 ml de solución se mezclan las cantidades indicadas a continuación:

| pH final | Solución A | Solución B |
|----------|------------|------------|
| 5.75     | 3.0 ml     | 97.0 ml    |
| 6.0      | 12.5 "     | 87.5 "     |
| 6.2      | 22.0 "     | 78.0 "     |
| 6.4      | 32.0 "     | 68.0 "     |
| 6.6      | 45.0 "     | 55.0 "     |
| 6.8      | 55.0 "     | 45.0 "     |
| 7.0      | 64.0 "     | 36.0 "     |



| pH final | Solución A | Solución B |
|----------|------------|------------|
| 7.2      | 72.0 ml    | 28.0 ml    |
| 7.4      | 79.0 "     | 21.0 "     |

Se mezclan las soluciones A y B en las proporciones indicadas y se determina el pH mezclando volúmenes iguales de amortiguador y BS. No es necesario ajustar, si se desea hacerlo, utilizar las mismas soluciones. Las soluciones de pH entre 5.75 y 6.6 se pueden almacenar sin esterilizar a 4 C las restantes es mejor almacenarlas esterilizadas en las condiciones estandar, para evitar la cristalización de las sales

- SOLUCION A

- NaCl 1.5 M ..... 100 ml
- Na2HPO4 2.0 M ..... 100 ml
- Agua dd ..... 800 ml

- SOLUCION B

- NaCl 1.5 M ..... 100 ml
- NaH2PO4 2.0 M ..... 100 ml
- Agua dd ..... 800 ml

Se preparan las soluciones concentradas y se mezclan. No es necesario esterilizar. Se puede almacenar a temperatura ambiente por más o menos dos meses.

- SUSPENSION DE KAOLIN AL 25 %

- kaolin (Fisher Sci.) ..... 25.0 g
- BS ..... 100 ml

Se suspende la cantidad que se desea preparar de kaolin en BS y se agita por lo menos 4 h a temperatura ambiente, se transvasa a un recipiente adecuado y se almacena a 4 C por un par de días antes de usarse. Procurar utilizar el mismo lote de

kaolin hasta donde sea posible pues la eficiencia varía considerablemente de lote a lote.

- MEDIO TPB-L 15

Caldo triptosa fosfato .....500 ml

Medio Leivowitz # 15 ..... 500 ml

Los medios se preparan por separado con agua doblemente destilada y desionizada (18 megaohms); se esteriliza el caldo triptosa fosfato en autoclave a 15 lb/plg<sup>2</sup> por 15 min, el medio de Leivowitz por filtración en unidad Millipore esteril con filtro de 0.2 micras.

- GLICEROL-PBS 70 %

glicerol ..... 70 ml

PBS ..... 30 ml

Se mezclan los componentes y se deja reposar por unos días. Se puede mantener almacenado por tiempo indefinido si se esteriliza en autoclave por 10 min a 10 lb de presión.

ESTA TEXTA NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla. I

Población encuestada según edad y sexo.

| GRUPO DE<br>EDAD (AÑOS) | TOTAL | %      | HOMBRES |       | MUJERES |       |
|-------------------------|-------|--------|---------|-------|---------|-------|
|                         |       |        | TOTAL   | %     | TOTAL   | %     |
| 1                       | 0     | 0.00   | 0       | 0.00  | 0       | 0.00  |
| 1- 4                    | 0     | 0.00   | 0       | 0.00  | 0       | 0.00  |
| 5-14                    | 40    | 28.99  | 8       | 20.00 | 32      | 80.00 |
| 15- 44                  | 62    | 44.93  | 21      | 33.87 | 41      | 66.13 |
| 45-64                   | 24    | 17.39  | 4       | 16.67 | 20      | 83.33 |
| 65                      | 8     | 5.80   | 3       | 37.50 | 5       | 62.50 |
| NO<br>DECLARARON        | 4     | 2.90   | 2       | 50.00 | 2       | 50.00 |
| TOTALES                 | 138   | 100.00 | 38      | 27.54 | 100     | 72.46 |

**Tabla II.**

**Signos y Síntomas más frecuentes encontrados en la población encuestada.**

|                                | <b>Total</b> | <b>%</b>    |
|--------------------------------|--------------|-------------|
| <b>FIEBRE</b>                  | <b>125</b>   | <b>90.6</b> |
| <b>DOLOR DE CABEZA</b>         | <b>126</b>   | <b>91.3</b> |
| <b>DOLOR MUSCULAR</b>          | <b>124</b>   | <b>89.9</b> |
| <b>ESCALOFRIO</b>              | <b>110</b>   | <b>79.7</b> |
| <b>DOLOR OCULAR</b>            | <b>108</b>   | <b>78.3</b> |
| <b>DOLOR DE ARTICULACIONES</b> | <b>117</b>   | <b>84.8</b> |
| <b>NAUSEA/VOMITO</b>           | <b>84</b>    | <b>60.9</b> |
| <b>ERUPCION</b>                | <b>51</b>    | <b>37.0</b> |
| <b>DOLOR DE GARGANTA</b>       | <b>72</b>    | <b>52.2</b> |
| <b>TOS</b>                     | <b>40</b>    | <b>29.0</b> |
| <b>DIARREA</b>                 | <b>49</b>    | <b>35.5</b> |
| <b>RINITIS</b>                 | <b>53</b>    | <b>38.4</b> |
| <b>ICTERICIA</b>               | <b>26</b>    | <b>18.8</b> |

Tabla. III

Datos de los enfermos que se les aisló el virus

| SUERO | EDAD (Años) | SEXO | FIEBRE | DENGUE<br>ANTES | SEROTIPO | TITULO DE IN |       |       |       |
|-------|-------------|------|--------|-----------------|----------|--------------|-------|-------|-------|
|       |             |      |        |                 |          | DEN 1        | DEN 2 | DEN 3 | DEN 4 |
| 0001  | 16          | M    | SI     | NO              | 4        | 640          | 40    | 0     | 40    |
| 0008  | 14          | F    | SI     | SI              | 4        | 1280         | 1280  | 1280  | 640   |
| 0020. | 13          | F.   | SI     | NO              | 4.       | 20.          | 10    | 0.    | 160   |
| 0032  | 8           | M    | SI     | SI              | 4        | 20.          | 0     | 0     | 1280  |
| 0040  | 37.         | M    | SI     | NO              | 4        | 0            | 0     | 0     | 640   |
| 0053. | 43.         | M.   | SI.    | NO.             | 4.       | 0.           | 0     | 0     | 10    |
| 0061  | 61          | M    | SI     | SI              | 4.       | 40           | 10.   | 40    | 80    |
| 0070  | 19.         | M    | SI     | SI              | 4        | 1280         | 160.  | 320   | 640.  |
| 0085  | 23          | F    | SI     | SI              | 4        | 1280.        | 1280  | 1280. | 1280  |
| 0099  | 34          | M    | SI     | SI              | 4        | 80           | 80.   | 80    | 160   |
| 0114  | 38          | F.   | SI     | NO              | 4        | 160          | 40.   | 80.   | 40.   |
| 0119  | 24          | F.   | SI     | NO.             | 4        | 0.           | 80    | 10    | 160   |
| 0120. | 22          | F.   | NO     | NO              | 4        | 0            | 0     | 0.    | 80    |
| 0122  | 10.         | M    | SI     | NO.             | 4        | 0            | 0     | 0     | 0     |
| 0130  | 24          | M    | SI     | SI              | 4        | 1280         | 1280  | 1280  | 1280  |
| 0136  | 38          | F    | NO     | NO              | 4        | 1280.        | 1280. | 1280  | 1280  |
| 0009  | 15          | F    | SI     | SI              | ND       | 1280         | 10    | 20    | 320   |
| 0022  | 10          | F    | NO     | NO.             | ND.      | 0            | 0     | 0     | 10    |
| 0026  | 31          | F    | SI     | SI              | ND.      | 0            | 0     | 0.    | 0.    |
| 0030. | 8           | M    | SI     | NO SABE         | ND       | 0            | 0.    | 0     | 0.    |
| 0034  | 7           | F    | NO     | NO              | ND       | 40           | 20    | 0     | 0     |
| 0039  | 27          | F    | SI     | SI              | ND       | 10           | 20    | 0     | 0     |
| 0054  | 31          | M    | SI     | NO SABE         | ND       | 1280         | 1280  | 1280  | 1280  |
| 0121  | 28          | M    | SI     | SI              | ND       | 20           | 10    | 10    | 20    |
| 0132  | 49          | F    | SI     | NO              | ND       | 1280         | 1280  | 1280  | 1280  |

ND. No Identificado

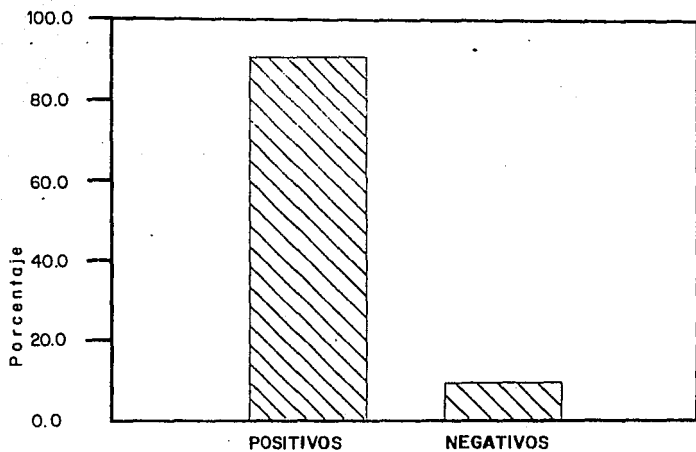


FIG. | Reactividad de las muestras de sueros por inhibición de la hemaglutinación (IH) con antígenos de dengue

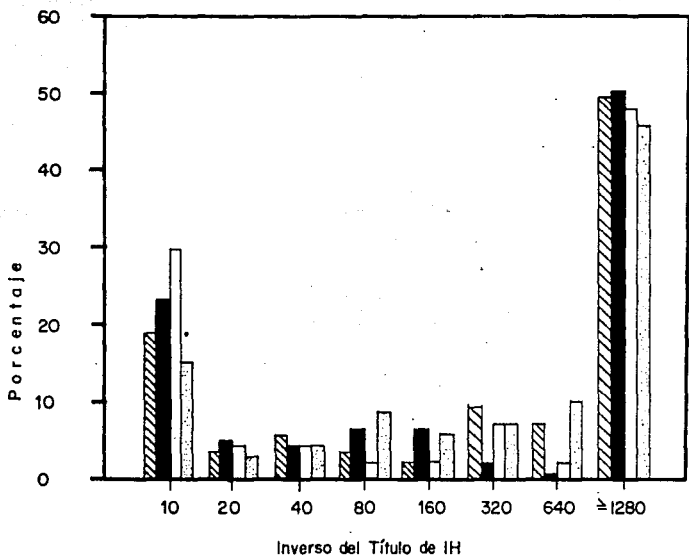
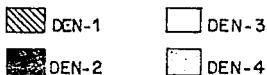


FIG.2 Título de inhibición de la hemaglutinación en los sueros colectados y probados con los 4 antígenos virales.



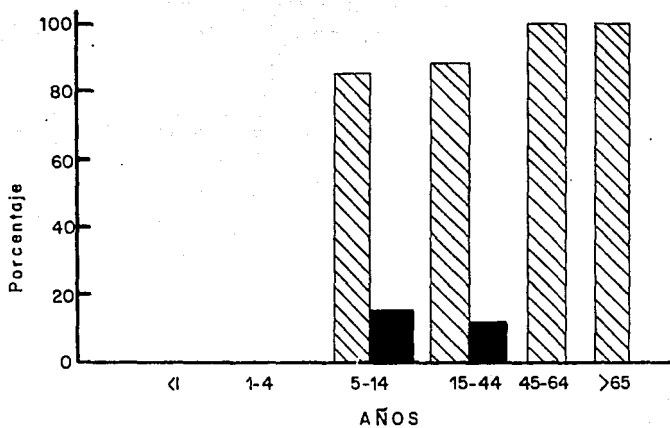


FIG. 3 Reactividad en IH por grupo de edad.

 Positivos

 Negativos



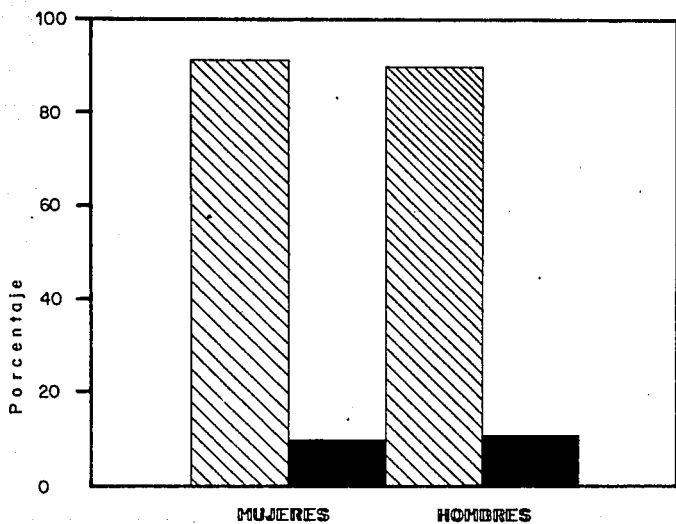




FIG.4 Reactividad en IH por sexo

 Positivos  
 Negativos

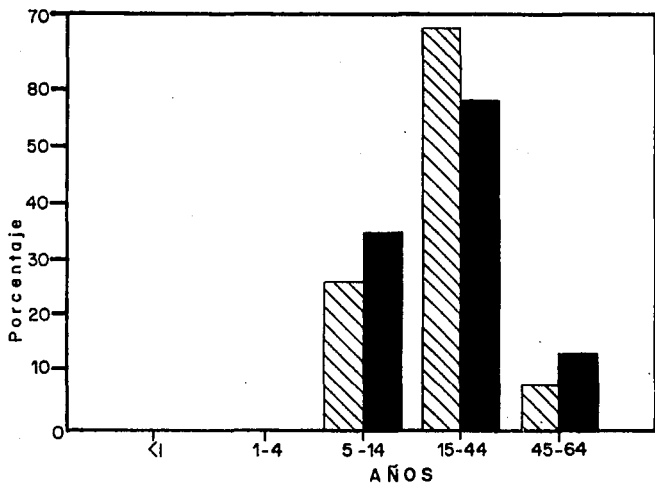




FIG. 5 Aislamiento del virus del dengue en el suero de pacientes según edad.

 SEROTIPO DEN-4  
 SEROTIPO NO IDENTIFICADO