

66
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

**ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE HEMAGLUTINACION
PASIVA EN CAPILAR Y CITOMETRIA DE FLUJO PARA DENGUE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE RODRIGUEZ MORENO

**ASESORES: Q. F. B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ
M. EN CM FRANCISCO JAVIER ALVARADO ALEMAN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEXICO

266377

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Nijáres
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estandarización de la Técnica de Hemaglutinación Pasiva en
Capilar y Citometría de Flujo para Dengue.

que presenta la pasante: Guadalupe Rodríguez Moreno
con número de cuenta: 8653118-A para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 22 de junio de 199 8

PRESIDENTE	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Andres Romero Rojas</u>	

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Virología Diagnóstica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E) de la Secretaría de Salud. Siendo mis asesores en este trabajo Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez y M. en C. M. Francisco Javier Alvarado Alemán.

A DIOS

Gracias, Señor por todo lo que
me has dado

A MIS PADRES

Dedico con amor y agradecimiento
a mi madre y a la memoria de mi
padre, la presente obra, fruto de
apoyo y comprensión que me han
brindado a lo largo de mi vida

GRACIAS

A MIS HERMANOS

Rodolfo, Reyna y Carlos
por todo el apoyo moral que
me han brindado durante toda mi
carrera profesional

GRACIAS

A MI MADRINA

Tere por haberme transmitido
sus sabios conocimientos y
ayuda para formarme como
profesionista

GRACIAS

A ANA LAURA Y FRANCISCO

**Por su valiosa asesoría para
el logro de esta tesis**

GRACIAS

A TODOS MIS PROFESORES Y EN ESPECIAL A:

**Andrea Becerril, Gerardo Cruz, Ana Laura Vázquez , Judith Martínez y
Andres Romero, por haberme transmitido sus sabios conocimientos sin esperar
nada a cambio.**

GRACIAS

A LA UNIVERSIDAD:

Por la oportunidad que me brindó
para mi formación profesional

GRACIAS

A TODA MI FAMILIA

Por sus palabras de apoyo y
la confianza que me transmitieron

MUCHAS GRACIAS

**A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL
CLUB SOBREVIVIENDO**

Por que me han demostrado su amistad en todo momento
con ustedes compartí momentos dulces y tragos amargos,
pero la gran amistad nos mantuvo unidos ante cualquier situación.

GRACIAS

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE TRABAJO

Por el apoyo y consejo que me han dado durante todo este tiempo

MUCHAS GRACIAS

**A todos aquellos que de alguna manera estuvieron pendientes
de la culminación de mi trabajo**

GRACIAS POR LA ESPERA

INDICE

	pag.
1.-Introducción	1-2
2.-Generalidades	
2.1 Historia	3-6
2.2 Características del Agente	7
2.2.1 Clasificación	7-8
2.2.2 Características Microscópicas	9
2.2.2.1 Propiedades Físicoquímicas del Virión	9
2.2.2.2 Propiedades Biológicas	9-13
2.3 Fisiopatología	14-18
2.4 Vectores	19-21
2.5 Caracteres Clínicos	22
2.5.1 Clasificación de Casos	22-26
2.5.2 Caso de Fiebre Hemorrágica del Dengue	27
2.5.3 Caso Clínico de Síndrome de Shock.....	29
2.5.4 Clasificación de la Gravedad del Dengue Hemorrágico	29
2.6 Diagnóstico	30
2.6.1 Métodos Serológicos	30

2.6.1.2 Método de ELISA de Captura de IgM	31
2.6.2 Métodos de Aislamiento	31
2.6.2.1 Cultivo Celular	31
2.6.2.2 Inmunofluorescencia Directa e Indirecta	32
2.6.3 Otros Métodos de Diagnóstico	32-33
2.7 Vacunas	34-35
2.8 Epidemiología	36-38
2.8.1 Vigilancia Epidemiológica del Dengue en México	39-40
2.9 Control	41-43
2.10 Tratamiento	44-46
2.11 Citometría de Flujo	47
2.11.1 Historia	47-49
2.11.2 Sistema de Fluidos	50
2.11.3 Sistema Optico	51-52
2.11.4 Marcadores	53-55
3.- Justificación	56
4.- Objetivos	57
5.- Material y Métodos	58
5.1 Material	58
5.2 Diseño Experimental	59

5.3 Prueba de Hemaglutinación	60-62
5.4 Método de ELISA de Captura de IgM para el Diagnóstico de Dengue	63-65
5.5 Determinación de Proteínas por el Método de Bradford	66
5.6 Hemaglutinación Pasiva en Capilar	67-68
5.7 Técnicas de Inmunofluorescencia	69
5.7.1 Inmunofluorescencia Directa	69-70
5.7.2 Inmunofluorescencia Indirecta	71-72
5.8 Citometría de Flujo Laminar	73
6.- Resultados	74-89
7.- Discusión	90-92
8.- Conclusiones	93
9.- Apéndice	94-96
10.- Bibliografía	95-102

INDICE DE FIGURAS

	pag.
Figura No. 1 Organización del genoma y regiones del RNA que codifican proteínas del virus del dengue	11
Figura No. 2 Mecanismo de Patogenicidad	15
Figura No. 3 Hembra de <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura No.4 Hembra de <i>Aedes albopictus</i>	19
Figura No. 5 Mapa de altitud mostrando la distribución probable de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura No.6 Características Clínicas y de laboratorio en Dengue Clásico ...	26
Figura No.7 Características Clínicas y de laboratorio en Dengue con Síndrome de Shock.	28
Figura No.8 Casos de Dengue Clásico. México 1978-1995	37
Figura No.9 Casos de Dengue Hemorrágico. México 1978-1995	37
Figura No.10 Fluido Laminar y Enfoque Hidrodinámico	51
Figura No.11 Componentes Opticos del Citómetro	53
Figura No.12 Histograma de Fluorescencia	55
Figura No.13 Prueba de Hemaglutinación (Titulación del Antígeno)	63
Figura No.14 Método de ELISA de Captura de IgM para el diagnóstico de Dengue	64
Figura No.15 Inmunofluorescencia Directa	70
Figura No.16 Inmunofluorescencia Indirecta	72

Figura No.17 Técnica de Inmunofluorescencia para la detección de 87
Dengue

Figura No.18 Técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar 88
con suero positivo y negativo de Dengue

Figura No.19 Técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar de suero 89
positivo de Dengue en microscopio invertido

INDICE DE TABLAS

	pag.
Tabla No.1 Clasificación del género Flavivirus	8
Tabla No.2 Proteínas de los denguevirus y su función	12
Tabla No.3 Diagnósticos Diferenciales más frecuentes del Dengue, Dengue Hemorrágico y otras enfermedades	23-25
Tabla No.4 Casos de Dengue Clásico acumulados por semana. Estados Unidos Mexicanos 1994-1997	38
Tabla No.5 Primera Fase: Selección de la concentración adecuada para utilizar los glóbulos rojos de carnero	77
Tabla No.6 Titulación del antígeno por Hemaglutinación	82
Tabla No.7 Cuantificación de Proteínas de los antígenos de Dengue	84
Tabla No.8 Establecimiento de la relación del reactivo con el suero del paciente para observar la Hemaglutinación Pasiva en Capilar... ..	84
Tabla No.9 Porcentaje de Positividad y Negatividad en relación con la técnica de ELISA y Hemaglutinación en Capilar	85
Tabla No.10 Especificidad de la Prueba de Hemaglutinación en Capilar	85
Tabla No.11 Sensibilidad de la Prueba de Hemaglutinación en Capilar a diferentes temperaturas.....	86

INDICE DE ABREVIATURAS

AP-61: Células de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*
BABS: Borato salino Albúmina bovina 4%
BHK-21: Células de riñón de Hamsters
C₆₃₆: Células de mosquito *Aedes albopictus*
CDC: Centro de control de Enfermedades en E.U
CID: Coagulación intravascular diseminada
Den-1: Dengue serotipo 1
Den-2: Dengue serotipo 2
Den-3: Dengue serotipo 3
Den-4: Dengue serotipo 4
DGV: Dextrosa Gelatina Veronal
ELISA: Ensayo inmunoenzimático
FA: Inmunofluorescencia
FHD: Fiebre Hemorrágica del Dengue
FSC: Luz dispersada hacia el frente
F₁, F₂ y F₃: Canales de Fluorescencia
HA: Hemaglutinación
Hela: Células cancerosas de cérvix humano
IFA: Inmunofluorescencia Indirecta
IFD: Inmunofluorescencia Directa
INDRE: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
LLCMK-2: Células de riñón de monorhesus
msnm: metros sobre el nivel del mar
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Buffer de fosfatos
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMT: Tubos Fotomultiplicadores
SCC: Luz dispersada hacia los lados
SSD: Síndrome de Shock por Dengue
TRA-284: Células de *Toxorhynchites amboinensis*
UHA: Unidad Hemaglutinante
VERO: Células de mono verde

RESUMEN

El Dengue es una enfermedad que cada vez infecta a más personas y ocurre en época de lluvia y después de ésta cuando los mosquitos del género *Aedes* proliferan en áreas donde se encuentran depósitos de agua estancada. Se han descrito cuatro serotipos Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4. Cada vez más incrementa el número de casos de ésta enfermedad y la severidad de los mismos, sobre todo en áreas rurales en donde los servicios médicos y de laboratorio escasean. Por tal motivo se pretende introducir y aplicar una técnica rápida y eficiente que apoye el diagnóstico en el campo donde se encuentra el enfermo.

La Hemaglutinación Pasiva es una técnica inmunológica que se basa en la utilización de eritrocitos como soporte para fijar proteínas ya sean antígenos o anticuerpos. Los glóbulos rojos de diversas especies han sido ampliamente utilizados como soportes, ya que son fáciles de obtener, de ser mantenidos en el laboratorio y de estandarizarse. Utilizando sueros positivos y negativos determinados por la técnica de ELISA (captura IgM) se realizó el ensayo de hemaglutinación pasiva en capilar obteniendo resultados en 30 minutos.

La Citometría de Flujo es una técnica que permite la medición simultánea, en una sola célula de varias características: tamaño, granularidad y fluorescencia. Por lo que nos facilitó la detección del virus adherido a la superficie de los glóbulos rojos de carnero y ganso separándolos de acuerdo a la intensidad de fluorescencia utilizando su respectivo testigo.

1. INTRODUCCION

El Dengue es un padecimiento infeccioso viral agudo causado por el denguevirus en cualquiera de sus serotipos (1,2,3 y 4) y transmitido por mosquitos del género *Aedes*.

El Dengue es una enfermedad que infecta cada vez a más personas, lo que ocurre sobre todo en época de lluvias y después de éstas, cuando los mosquitos *Aedes aegypti* proliferan en áreas donde se encuentran depósitos de agua estancada.

Las manifestaciones clínicas de la infección de los virus del Dengue son: fiebre elevada, cefaléa, dolor retroocular, malestar general, debilidad, dolores musculares y articulares; en un porcentaje variable es acompañado por un exantema maculopapular generalizado. Los síntomas y signos adicionales incluyen tos, diarrea, náusea y vómito.

Para integrar el diagnóstico de la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) se requiere, además de las manifestaciones clínicas ya mencionadas, comprobar la disminución de las plaquetas (menor a 100,000) y el aumento en un 20 % ó más del hematocrito.

El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (I.N.D.R.E.) cuenta con procedimientos de diagnóstico para el Dengue por medio de cuantificación de anticuerpos de clase IgM en suero recolectado entre el sexto y el vigésimo día; en los primeros 5 días del cuadro febril la muestra que se toma, sirve para intentar el aislamiento del virus en cultivo de tejido de mosquito (C₆₃₆ ó TRA₂₈₄).

En México sólo habían circulado los serotipos Den-1, Den-2 y Den-4 lo cual había afectado a 29 localidades federativas hasta agosto de 1995; y Den-3 se introdujo al país por el municipio de Suchiate, en el estado de Chiapas, a principios de agosto de 1995.

El diagnóstico de dengue se realiza por las técnicas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IHA (Inhibición de la Hemaglutinación), Cultivo Celular e Inmunofluorescencia. Estas técnicas se reproducen en laboratorios con una infraestructura desarrollada, ya que requieren de un material costoso como son: campana de flujo laminar, microscopio de luz ultravioleta, estufa, lector de ELISA, reactivos, tiempo y personal capacitado.

La Hemaglutinación Pasiva es una técnica inmunológica que se basa en la utilización de eritrocitos como soporte para fijar proteínas de los antígenos.

Los glóbulos rojos, de diversas especies han sido ampliamente utilizados como soportes, ya que son fáciles de obtener y de ser mantenidos en el laboratorio. A los eritrocitos frescos se les puede acoplar moléculas pequeñas.

La Citometría de Flujo es una técnica que permite la medición simultánea, en una sola célula de varias características: tamaño, granularidad y fluorescencia. El citómetro de flujo analiza una población de células en un tiempo muy corto de 1,000 a 10,000 células por segundo como promedio. Es un proceso en el cual las mediciones son hechas cuando las partículas pasan en línea, en una corriente líquida, a través de un rayo láser.

En el presente trabajo se pretende introducir y aplicar una técnica rápida y eficiente que apoye el diagnóstico de dengue a nivel de laboratorio y sobre todo en el campo cuando se presente un brote epidémico en cierta parte del país.

2. GENERALIDADES

2.1 HISTORIA

El término de dengue fue introducido del español a la literatura médica inglesa en los años 1827-28 durante una epidemia en el Caribe, caracterizada por exantema y artalgias. El cual es una traducción del swahili: denga, dyenga o ki denga pepo, que describe "un golpe súbito causado por un espíritu maligno". El nombre de Knokkel-Kiirts dado en Indonesia en 1779, y el de break-bone fever o dandy fever dado en Filadelfia en 1780 fueron términos utilizados para describir la enfermedad que ahora reconocemos como dengue.

La fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y el síndrome de shock por dengue (SSD) fueron identificados por primera ocasión en Australia en 1897 y en Grecia en 1928. El cuadro clínico fue reconocido y estudiado en Manila en 1954 y en Tailandia en 1958 (fiebre hemorrágica del Tahi). El misterio concerniente al agente causal fue resuelto cuando los serotipos 2, 3 y 4 del dengue virus fueron aislados en Filipinas en 1956 y el serotipo 1 en Tailandia en 1958. Entre 1953-1964 la FHD fue descrita en la India, Malasia, Filipinas, Singapur, Tailandia y Vietnam. A partir de entonces existió un considerable aumento en el reporte de casos principalmente en el sureste de Asia y en la región oeste del Pacífico.

Las primeras noticias de dengue en América son de 1635 cuando los colonizadores franceses informaron de una extraña dolencia que llamaron "coupe de barre".

La primera descripción clínica del dengue en el continente Americano data de 1780, cuando ocurrió una gran epidemia en Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos. (1) Se han descrito brotes de padecimientos similares al dengue desde el siglo XVIII.

Entre 1826 y 1828 se describió una gran epidemia de algo semejante al dengue, en el Sur de los Estados Unidos y en los países del Caribe, adquiriendo en este brote el nombre de dengue. (2)

Los estudios serológicos en Panamá sugieren que el dengue tipo 2 fue el responsable del brote de 1941- 1942 también estuvo presente el serotipo dengue 3. (3)

En 1944-1945 Sabin y colaboradores, aislaron varias cepas de dengue virus por inoculación de suero infectante en voluntarios humanos durante la guerra en el Pacífico Sur. Distinguieron dos serotipos diferentes (Hawaii y New Guinea, ahora llamados Den-1 y Den-2).

Estos fueron reconocidos con base en la susceptibilidad de voluntarios al reto heterólogo, después de la convalecencia de una infección natural por denguevirus.

Posteriormente los virus Den-3 y Den-4 fueron identificados a partir de cepas virales aisladas durante las epidemias de fiebre hemorrágica en Filipinas.

En el pasado fué un evento aislado, en los últimos años se ha visto un aumento paulatino en la frecuencia y número de casos reportados. (4)

De 1950 a 1960 se hicieron esfuerzos para eliminar al principal vector de los virus del dengue y la fiebre amarilla, el Aedes aegypti fue erradicado de México, Panamá, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil, las Islas Caimán y las Bermudas. Desafortunadamente, éste logro no fue total por no haberse combatido el vector en todo el Continente Americano, teniendo como resultado repetidas reinvasiones del mismo en dichos países. (5)

En la década de los años 70 se redujo el apoyo económico para la vigilancia y su control, por lo que, a finales de la década, la mayoría de los países de la región se vieron reinfestados con Aedes aegypti . En 1977 el serotipo 1 causó brotes extensos en el Caribe, especialmente en Jamaica. Se extendió a América del Sur por Colombia y Venezuela. También a Honduras, El Salvador, Guatemala y Belice, llegando a México a finales de 1978.

Para los años 1977-1980 se reportaron en América más de 702,000 casos de dengue, predominantemente asociados al serotipo 1.

En la década de los años 80, se describieron en los países americanos brotes explosivos. El serotipo 3 se ha introducido, por viajeros provenientes de Asia, en numerosas ocasiones en la década de los años 80. (6)

Un evento importante y el más grave en la historia de la epidemiología del dengue ocurrió en Cuba en 1981, con el serotipo 2.

El serotipo 4 comenzó a circular en América en 1981 proveniente de la Polinesia Francesa, inició su actividad en forma de brotes extensos en el Caribe, en Centroamérica, posteriormente en México y Sudamérica, alcanzando endemidad en la región.

En Centroamérica, en 1982-83, hubo algunos brotes en El Salvador relacionados con el serotipo 4. Afectó a muchas islas en el Caribe en 1981-1982, como Curazao, Dominica, Granada, Guadalupe, Haití, Jamaica, con cuadros benignos de la enfermedad. En Sudamérica, ha circulado en la región norte en Colombia, Venezuela y Surinam, en donde también se reporta actividad de los otros 3 serotipos.

En 1982, en Colombia se consideró que un 10% de la población fue afectada por un padecimiento similar al dengue. En Nicaragua, en 1985, hubo dos ondas epidémicas, una a principio del año con circulación exclusiva del serotipo 1 y otra, a finales, cuando circularon simultáneamente los serotipos 1 y 2 (7). Se reportaron alrededor de 17,500 casos con algunas muertes. En 1987 ocurrieron brotes asociados a tres serotipos, predominando el serotipo 4. Los casos han sido de tipo benigno, aunque también se registraron casos de dengue hemorrágico y Dengue con Síndrome de Choque, especialmente en los años 1986-1988.

En México los primeros casos con manifestaciones hemorrágicas ocurrieron en 1983, relacionados con epidemias por Den-1. En 1984, en Yucatán un brote predominante por Den-4 donde ocurrieron 9 casos de dengue hemorrágico, de los cuales 4 fueron fatales. Así, México pasó a ser un país que manifiesta epidemias cada año, han circulado tres serotipos endémicamente y han ocurrido casos esporádicos de dengue hemorrágico.

En Puerto Rico la primera epidemia reportada ocurrió en 1915, después otra en 1945 y otra más en 1963. La cuarta epidemia por dengue ocurrió en el año de 1969 y desde entonces la transmisión endémica ha persistido. Desde 1977 Puerto Rico ha manifestado 7 epidemias de dengue, causada por los cuatro serotipos del virus y, a finales de 1985, circularon simultáneamente tres: Den-1, Den-2 y Den-4, coincidiendo con esta hiperendemicidad, es que ha surgido la fiebre hemorrágica (FDH) y el síndrome de shock del dengue (SSD).

Un caso de fiebre hemorrágica y síndrome de shock del dengue implicó al mismo tiempo criterios de definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y fue causado por Den-1 y el otro (diagnosticado como púrpura trombocitopénica idiopática) fue por Den-2.

En 1986 fueron reportados casos de dengue hemorrágico, 29 de ellos llenaron los criterios de la Organización Mundial de la Salud para la fiebre hemorrágica y el síndrome de choque del dengue. Los serotipos que causaron la mayoría de los casos severos fueron el Den-4 y Den-2.

Este patrón, de la fiebre hemorrágica y el síndrome de choque del dengue esporádico, continuó ocurriendo durante 1987 y 1988 asociado con pequeños brotes. Casos confirmados de dengue aumentaron en forma dramática en 1986 y permanecieron elevados en 1987 y 1988.

En México, de 1983 a 1993, se han aislado 461 serotipos de los cuales el 56% son Den-1. Los serotipos Den-2 y Den-4 han sido detectados en diferentes años y en varios estados (Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Morelos, Campeche, Yucatán, Guerrero y Jalisco), donde se ha podido demostrar el aumento en la tasa de incidencia adjudicable a la presencia de éstos serotipos. (8)

El dengue en el Continente Americano tiene cada día más importancia, por la constante amenaza de que se presenten epidemias de dengue hemorrágico, de la magnitud de la que se presentó en Cuba en 1981, en Venezuela en 1989 y en Brasil en 1990-91.

El riesgo se mantiene latente al constatar que tres serotipos circulan en la región, aunque el serotipo 3 no se había detectado desde hace ya varios años. (9)

Otro factor que contribuye a que el dengue se conforme como un problema emergente de salud pública es la reciente aparición del Aedes albopictus en Brasil, República Dominicana y en dos estados de la frontera nortede México (Coahuila y Tamaulipas).

2.2 CARACTERISTICAS DEL AGENTE

2.2.1 CLASIFICACION

Los flavivirus se incluían, hasta hace poco tiempo, en la familia Togaviridae, pero debido a las diferencias en cuanto a tamaño, morfología, secuencia genética y estrategia de replicación, se ha hecho necesaria su clasificación como una familia independiente. (10)

El virus del dengue y sus cuatro serotipos, que antes fueron clasificados, en 1974, por el "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) dentro del género flavivirus, Familia Togaviridae, además de los géneros alfavirus, pestivirus, rubivirus y otros miembros adicionales; recientemente han sido reclasificados, junto con los otros miembros de este género, en la Familia Flaviviridae.

Para esta reclasificación las principales razones que se adoptaron fueron:

- a) En las células infectadas por flavivirus, no se ha detectado RNAm, subgenómico de 26 S, que corresponde a la porción 3' del genoma que codifica para proteínas estructurales.

- b) En el sistema de traducción libre de células el RNA de los flavivirus genera solo proteínas estructurales, mientras que el RNA genómico de los alfavirus genera proteínas no estructurales.

- c) El tamaño de los flavivirus es aproximadamente, 50 nm de diámetro y el de los otros géneros de la familia de los Flaviviridae es de 50-70 nm.

Basándose en éstos criterios se creó la familia Flaviviridae. Tabla No.1 La que incluye a más de 60 virus y fué aprobada por el ICTV en 1984, el prefijo de la familia se derivó de flavus (amarillo) y se refiere a la especie tipo, que es el virus de la fiebre amarilla. (11)

**TABLA NO. 1
CLASIFICACION DEL GENERO FLAVIVIRUS**

FAMILIA: FLAVIVIRIDAE
GENERO : Flavivirus

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

El término de virus transmitidos por artrópodos o arbovirus (del inglés arthropod-borne virus) se acuñó, en 1942, para referirse a los virus animales cuyo ciclo de vida incluye un huésped artrópodo, en el que se multiplica antes de que el animal lo transmita a hospederos vertebrados. A éste grupo pertenecen las diferentes familias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae y Rhabdoviridae. (12)

2.2.2 CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

2.2.2.1 Propiedades Fisicoquímicas del Virión:

Los denguevirus tienen aproximadamente 45 nm de diámetro, su genoma es de RNA de una cadena, rodeado por una nucleocápside icosaédrica o isométrica de unos 30 nm de diámetro. La nucleocápside está cubierta por una envoltura lipídica. (11,13,14)

La densidad del virión determinada por un gradiente de centrifugación es de 1.23 g/cm^3 utilizando oxido de deuterio en sacarosa y un coeficiente de sedimentación alrededor de S_{20w} . (15)

Estos virus son susceptibles a la inactivación con desoxicolato de sodio, éter etílico, cloroformo, radiaciones gamma, luz ultravioleta, desinfectantes incluyendo formaldehído al 3-8 %, con glutaraldehído al 2%, con peróxido de hidrógeno del 2 al 3 %. (16)

La hidrólisis con β -propiolactona y la formalina los inactiva dejando intacta su capacidad antigénica, de donde se deriva que la cubierta de lípidos se encuentra asociada a la infectividad.

Los flavivirus también son inactivados rápidamente a temperaturas altas, utilizando una temperatura de 50°C su infectividad se pierde con el 50% en solo 10 minutos. En cambio a temperaturas bajas de -60°C o más se conserva la infectividad del virus.

2.2.2.2 Propiedades Biológicas:

El ensamble y maduración de los viriones puede ocurrir a través de procesos de condensación de vacuolas intracitoplasmáticas. Las partículas maduras dentro de las vacuolas, son liberadas extracelularmente por fusión con la membrana plasmática o en células severamente dañadas por lisis de la membrana plasmática.

Los hospederos vertebrados naturales incluyen una gran variedad de animales domésticos y silvestres de varias especies (aves, mamíferos), el hombre es un hospedero accidental. (17)

Los virus se multiplican en artrópodos hematófagos, que comúnmente son los mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* obteniéndose elevados índices de virus en ellos.

En animales de laboratorio se replican en: monos (*Macacus rhesus*), embrión de pollo, ratón lactante y hamsters, observándose en ellos parálisis y muerte. También se utilizan cultivos celulares como: las células de mosquito C₆₃₆ (*Aedes albopictus*), TRA-284 (*Toxorhynchites amboinensis*), AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*), y las líneas establecidas LLC-MK₂ (continuas de riñón de mono rhesus), Vero (continuas de riñón de mono verde), Hela (células cancerosas de cérvix humano).(18)

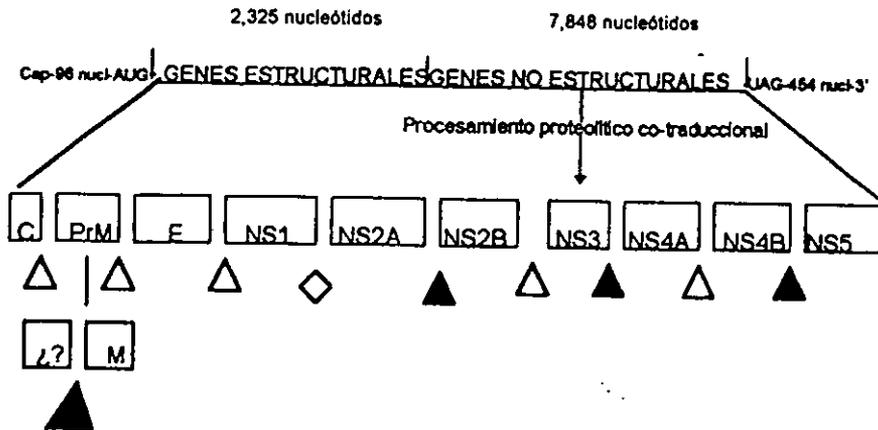
Genoma Viral

El RNA del virus del dengue tiene un coeficiente de sedimentación de 42S, peso molecular de 3.3×10^6 y con extremo 5' cubierto; es infeccioso, tiene una polaridad positiva y puede ser traducido in vitro. Figura 1 (15)

El análisis de la secuencia del DNAC obtenido a partir del RNA usando transcriptasa inversa, fue primero realizada para el virus de la fiebre amarilla y, después, se ha usado para secuenciar el de otros flavivirus: Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4; así como la Encefalitis Japonesa, Encefalitis del Oeste del Nilo y la Encefalitis de San Luis. (19)

Actualmente los flavivirus han sido clonados y secuenciados, surgiendo la posibilidad de obtener clonas de DNAC infecciosos y se ha construido una del virus de la fiebre amarilla. La disponibilidad de clonas infecciosas de flavivirus ha permitido explorar la función de los genes virales y desarrollar vacunas atenuadas mejores, a través de la mutagénesis específica de sitios genómicos. (20)

Figura 1
Organización del genoma y regiones del RNA que codifican proteínas del virus del dengue



Los triángulos abiertos indican los probables sitios de rompimiento de la enzima signalase
 Los triángulos negros señalan el rompimiento posible de proteasas que atacan después de dos aminoácidos básicos. El diamante muestra un sitio de hidrólisis a cargo de una proteasa aún no identificada.

Envoltura viral:

La envoltura membranar de los flavivirus deriva de la célula hospedera de la cual emerge el virus. Esta envoltura se fusiona con la membrana de la célula blanco durante la penetración del virión, promovida por un dominio presente en la proteína E. (21,22)

Proteínas estructurales:

La nomenclatura para las proteínas de los flavivirus fue propuesta por Rice y Col. Tabla No. 2. El virión maduro contiene tres proteínas estructurales: proteína C de la nucleocapside o core; proteína M asociada a la membrana y proteína E de la envoltura. El virus intracelular inmaduro tiene la proteína prM, a veces citada como pre(M), que es precursora de la proteína M. Las proteínas virales derivan de un polipéptido precursor único o poliproteína. (23,24)

Tabla No. 2

Proteínas de los denguevirus y su función

	NOMBRE	GLICOSILACION	kDa	FUNCION
Proteínas Estructurales	C	no	13.5	nucleocápside
	prM	si	22	precursoa de la proteína M
	M	no	8	proteína de la membrana
	E	si (1)	51-60	proteína de la envoltura
	NS1	si	48	¿ensamblaje viral?
Proteínas No Estructurales	NS2a	no	20	¿procesadora de la NS1?
	NS2b	no	14.5	desconocida
	NS3	no	70	proteasa/¿NTPP asa? desconocida
	NS4a	no	16	desconocida
	NS4b	no	27	¿RNA polimerasa?
	NS5	no	105	

(1) La proteína E está glicosilada en los denguevirus, pero no en el resto de los flavivirus.

Los genes que codifican estas proteínas están en el extremo 5' del genoma, comprenden un poco más de un cuarto de la capacidad del RNA viral y su orden es: C-prM (M)-E.

La glicoproteína E (51-60 kDa) es el componente principal de la envoltura y es un homotrímero. A esta molécula están asociados los dominios funcionales responsables de la neutralización del virus, de la hemaglutinación de eritrocitos de ganso, de la fusión celular y de la interacción con receptores específicos de la célula del hospedero.

Proteínas no estructurales:

Se han identificado siete proteínas no estructurales: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5. La NS1 es la que puede tener mayor importancia inmunológica puesto que las células infectadas que la expresan se convierten en blanco para la citólisis inmune. (25,26,27)

2.3. FISIOPATOLOGIA

Los eventos inmunológicos son fundamentales para entender la fisiopatología de la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y el Síndrome de Shock de Dengue (SSD).

Los individuos infectados con un serotipo mantienen una prolongada memoria inmunológica para evitar ser infectados por serotipos homólogos, es decir por el mismo serotipo; así mismo tienen un corto período de protección cruzada contra los serotipos heterólogos, después de que pasa este pequeño periodo de tiempo, son completamente susceptibles a la infección contra otros serotipos.

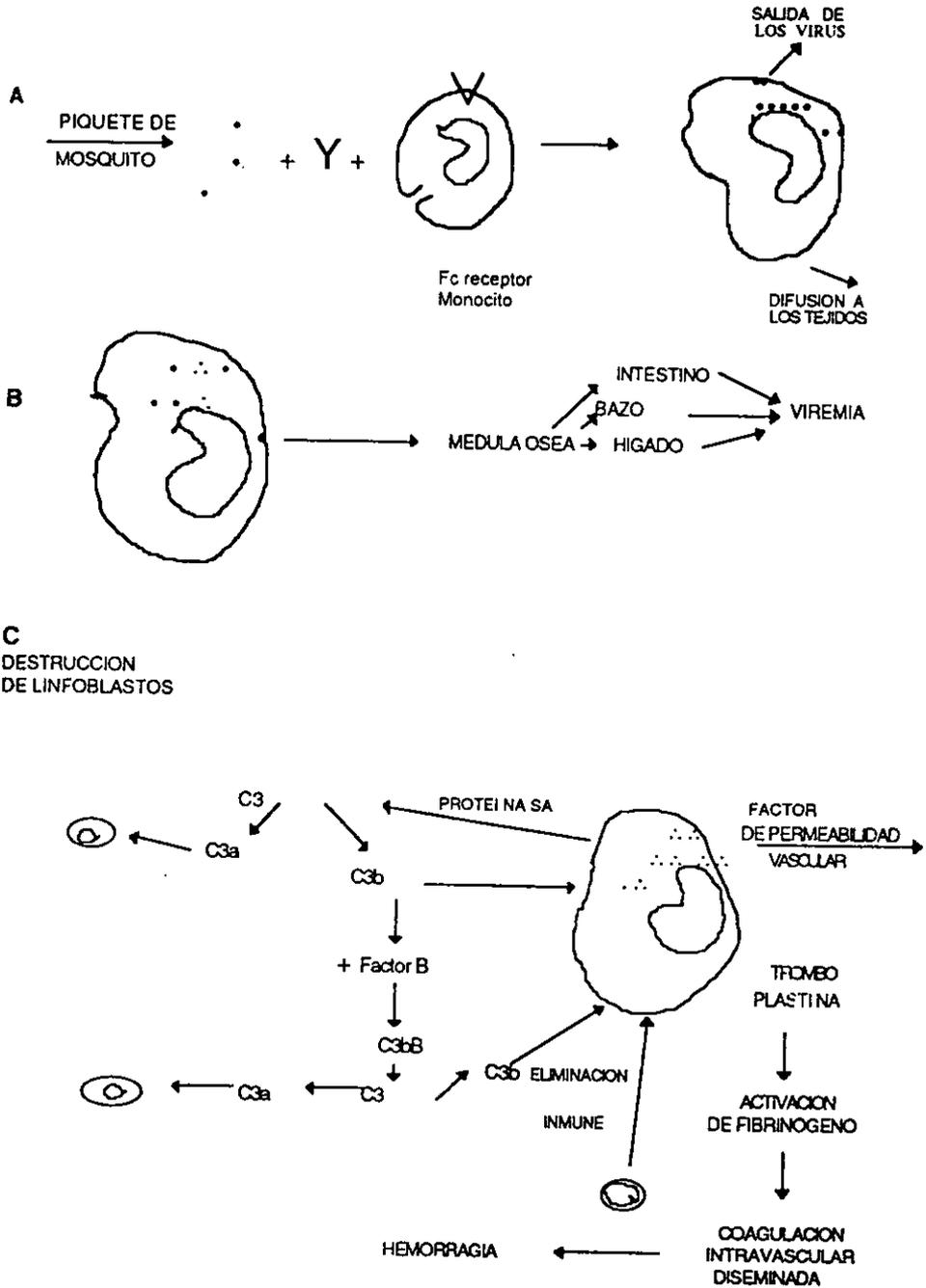
La infección primaria y secundaria pueden ser distinguidas por respuestas serológicas características. Los anticuerpos formados en las infecciones primarias son en su mayor parte de la clase IgM y están dirigidos principalmente contra los determinantes antigénicos tipo específicos del virus dengue.

Las infecciones secundarias inducen anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos del grupo flavivirus. Estos complejos formados por IgG1 e IgG3 (subclases que más se producen en las infecciones virales) participan en la activación del complemento por la vía clásica, además facilita la opsonización, uniéndose firmemente a los receptores del Fc de los monocitos y macrófagos.

Los complejos antígeno-anticuerpo que se forman durante una infección secundaria facilitan la infección de nuevas células mononucleares. Los monocitos infectados se vuelven los blancos de los mecanismos inmunes y al ser atacados liberan los mediadores químicos que aumentan la permeabilidad capilar, activan al complemento, liberan tromboplastina y en su conjunto provocan los cambios fisiopatológicos propios de la fiebre hemorrágica del dengue. Figura No. 2

Varios estudios han demostrado que la cantidad de dengue virus, la cantidad de complejos inmunes, el consumo de complemento por la vía clásica y las disminuciones en la circulación de C3^{*}, C4^{*} y C5^{*} están en relación con la severidad de la enfermedad. (28)

FIGURA NO. 2 MECANISMO DE PATOGENICIDAD



Descripción de la figura No.2

A) En presencia de anticuerpos se unen los complejos inmunes (Anticuerpo-virus que facilita la opsonización uniéndose firmemente a los receptores del Fc, posteriormente a los fagocitos en donde existe replicación viral. Ya que los fagocitos mononucleares pueden ser móviles, distribuyen la infección y eligen un sitio apropiado para la replicación.

B) El dengue virus crece en la médula ósea, hígado, tejido linfoide, bazo y en los histiocitos de la piel. La hipótesis que los anticuerpos reforzados regulan el número de células infectadas, a mayor número de células infectadas, mayor severidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

C) Las principales anomalías fisiopatológicas son causadas por la activación de los fagocitos mononucleares activados que son infectados con dengue. La respuesta inmune, posiblemente de linfocitos T, puede ser importante en la activación de fagocitos mononucleares. La nutrición, el sexo y factores genéticos pueden ser importantes en la modulación de infecciones individuales a través del efecto regulador de los linfocitos T o de la función de los fagocitos mononucleares.

La célula blanco de los virus del dengue es el monocito o fagocito mononuclear, en cuyo interior se produce la replicación viral. En la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) se produce un fenómeno inmunopatológico característico. Este consiste en un aumento de la infección mediado o favorecido por anticuerpos.

Si la persona que tiene anticuerpos no neutralizantes contra alguno de los virus del dengue resulta infectada por un nuevo virus (de un serotipo distinto al de la infección primaria) va a desarrollar una forma particular de inmunocomplejos (virus dengue/inmunoglobulina G) que van a facilitar la penetración de aquél en el fagocito mononuclear a través del receptor Fc. Esto va a resultar en una alta replicación viral, elevada viremia y la agresión del virus a muchas células del organismo.

Los factores relacionados con el virus podrían ser la capacidad de una determinada cepa viral de replicarse en los fagocitos mononucleares o de tener atributos antigénicos para optimizar la inmunoamplificación como antígenos de superficie o sitios para su fijación y entrada al leucocito.

En la infección por virus del dengue se ha encontrado elevada producción de interleucina 2 e interferón gamma, lo que evidencia la activación de linfocitos T. La inmunopatología de la Fiebre Hemorrágica del Dengue está en gran medida relacionada con respuestas de células T. La activación de estos linfocitos ocurre en pacientes con dengue clásico y en aquellos con dengue hemorrágico, pero en estos últimos los niveles de activación son muy superiores.

Las infecciones primarias por virus dengue inducen linfocitos T citotóxicos de memoria (CD4⁺ y CD8⁺) específicos de serotipo y también de reacción cruzada entre serotipos.

En las infecciones secundarias por virus dengue de distinto serotipo al que causó la infección primaria se produce una activación de linfocitos citotóxicos CD4⁺ CD8⁺ o más intensa y un número muy elevado de monocitos infectados. Es probable que la activación de monocitos y macrófagos en la Fiebre Hemorrágica del Dengue se deba a la acción del interferón gamma liberado por los linfocitos T.

La rápida liberación de citocinas y mediadores químicos producidos por la activación de células T y por la activación y/o lisis de los monocitos infectados por el virus podría causar la extravasación de líquidos y las hemorragias que ocurren en la Fiebre Hemorrágica del Dengue. También se activa el complemento con la correspondiente producción de anafilatoxinas (que contribuyen al síndrome de fuga capilar) y su acción final de lisis de células. Se han detectado partículas o antígenos virales en monocitos en riñón, tejido cutáneo, hígado, bazo, timo y pulmón, así como infiltrados mononucleares en las biopsias musculares de pacientes con mialgias durante el dengue. Los diferentes estados de diferenciación de una línea de células monocíticas influyen en su susceptibilidad a la infección por virus del dengue por lo que un posible mecanismo sería que los monocitos infectados participantes en la diapédesis, (por el aumento de la permeabilidad vascular) pudieran diferenciarse lo suficiente durante este proceso como para liberar virus y citocinas en sitios localizados de los vasos sanguíneos.

Las hemorragias en el dengue son un fenómeno: diapédesis, trombocitopenia, alteración en los mecanismos de la coagulación y otros. La trombocitopenia en particular, se acepta que los mecanismos que producen se determinan en el curso de infecciones virales y pueden ser multifactoriales entre ellos: a) la penetración del virus en las plaquetas o sus precursores los megacariocitos, los cuales ofrecen un medio adecuado para la replicación, b) los virus pueden fijarse o adsorberse a las plaquetas provocando su agregación o degranulación, lo cual puede conducir a trombosis intravascular con disminución de plaquetas y factores de la coagulación y c) mecanismos de tipo inmunológico, se han encontrado inmunocomplejos antígeno dengue/inmunoglobulina G en las plaquetas hasta el 48% de los pacientes con fiebre hemorrágica del Dengue.

Un alto porcentaje de estas plaquetas sensibilizadas son destruidas en el curso de una coagulación intravascular diseminada (CID), son removidas por el sistema macrófago/fagocítico, o se produce su lisis por la acción del complemento, tanto por activación de su vía clásica como por la alternativa.

La coagulación intravascular diseminada ha sido descrita en el dengue hemorrágico y considerada como factor importante en la producción de sangrados. También se ha encontrado en pacientes con Fiebre Hemorrágica del Dengue anticuerpos de reacción cruzada contra el plasminógeno que disminuyen el proceso de coagulación, los cuales podrían ser causa o contribuir a las hemorragias en las infecciones por dengue: se trata de anticuerpos contra la glicoproteína E de la envoltura del virus. (29)

2.4 VECTORES

Se conocen varias especies de vectores de dengue virus distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Todos los mosquitos de la familia *Culicidae*, género *Aedes*, concretamente especies del subgénero *Stegomyia* y del grupo *S. scutellaris*. La mayoría se distribuye en Asia y Africa, pero dos se encuentran actualmente en el Continente Americano, *Aedes aegypti* (Figura 3) y *Aedes albopictus*. (30) (Figura 4)

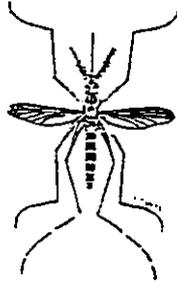


Figura No.3 Hembra de *Aedes aegypti*

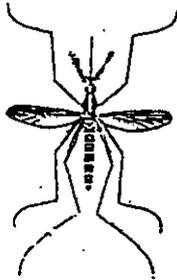


Figura No.4 Hembra de *Aedes albopictus*

Estos mosquitos pasan por tres fases en su ciclo de vida: la etapa acuática, que consta de los estados de huevo, larva y pupa y la fase aérea que corresponde al estado adulto que es el alado.

El *Aedes aegypti* es una especie originaria de la región etíope, que se cree fue traída al Continente Americano tan pronto se iniciaron los viajes europeos de exploración y de conquista. Esta especie se encuentra distribuida en las áreas tropicales y subtropicales del mundo, en general dentro de las latitudes 35°N y 35°S. La distribución está limitada altitudinalmente cerca de la línea ecuatorial puede encontrarse a gran altura, por ejemplo en Colombia a 2,200m con una temperatura media de 17°C. En zonas geográficas más alejadas del Ecuador, es raro que la especie se encuentre por encima de los 1,000 metros snm. (32)

En el Continente Americano, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los vectores de los denguevirus. Son especies que se encuentran en zonas suburbanas y rurales. Se cría en recipientes artificiales y naturales localizados dentro o en los alrededores de las viviendas humanas, como son barriles metálicos, cisternas, tambos, floreros, llantas, latas, botes, cubetas, agujeros en árboles o entre las hojas de plantas tropicales. Los huevos son depositados en áreas húmedas, sombreadas y en agua limpia aunque también se desarrollan en agua sucia o contaminada. La precipitación pluvial mantiene los cuerpos de agua adecuados para su crianza, pero en épocas de sequía o en áreas con escasa precipitación, el patrón conductual humano de acumular agua para el consumo doméstico favorece la proliferación. Su ciclo de vida es alrededor de ocho semanas y al infectarse, permanecen infectantes de por vida.

La hembra succiona la sangre del hombre y también de animales domésticos. La distribución real y actual del vector es muy difícil de conocer ya que sólo existe información para las grandes áreas urbanas porque las encuestas entomológicas son escasas en las áreas rurales. (33)

En México se ha encontrado prácticamente en todos los estados, en las regiones por abajo de los 1,200 metros de altura, con excepción de Baja California Norte, Tlaxcala y Distrito Federal, sin embargo ya se presentó en dos localidades ubicadas a 1,630 metros en Morelos y a 1,700 metros en Guerrero. Figura No.5

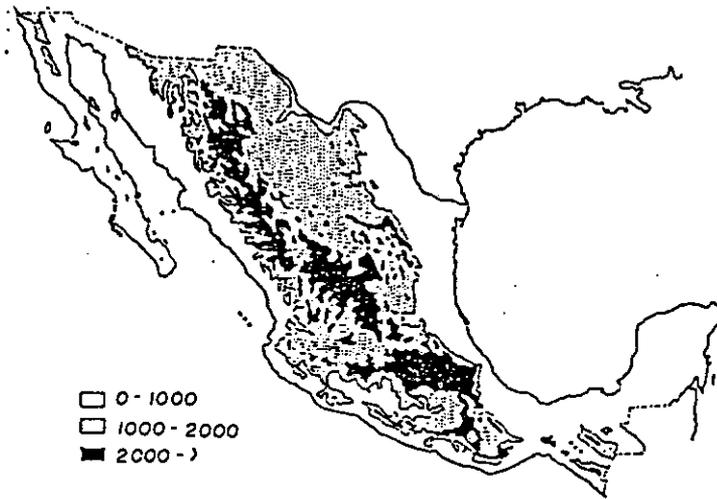


Figura No. 5 Mapa de altitud mostrando la distribución probable del *Aedes aegypti* en México. Las áreas blancas representan de cero a 1,000 m sobre el nivel del mar, las punteadas de 1,000 a 2,000 m y las negras altitudes por encima de los 2,000 m.

El vector *Aedes albopictus* es un vector secundario a pesar de que es más susceptible a la infección oral y parenteral que *Aedes aegypti*; está mejor dotado para la transmisión transovárica de los virus dengue. Es una especie oriental, se ha encontrado en China, Japón y Asia; pero en los últimos años ha aumentado su distribución geográfica. En 1985 se detectó en Houston, Texas y en 1986 en el estado de São Paulo, Brasil. Para el año de 1988 se encontró larvas en la población fronteriza de Matamoros, Tamaulipas. Para el año de 1993 se encontraron en Santo Domingo y posteriormente en tres comunidades del estado de Coahuila así como en el estado de Tamaulipas en México. (32)

Aedes aegypti adquiere la infección al picar a un individuo enfermo desde antes de la aparición de la fiebre y durante la etapa febril. Existe un período mínimo de 6 a 8 días necesario para que el mosquito reproduzca al virus en su tubo digestivo y se vuelva infectante y capaz de transmitir la infección; este período se denomina de incubación extrínseca. Una vez infectado el mosquito será capaz de transmitir la infección y funcionar como vector el resto de su vida.

Los factores que influyen en el vector para transmitir la infección son: la preferencia por un huésped humano, los hábitos de picadura, las variables del macroambiente (temperatura, clima, precipitación pluvial, humedad, vegetación) la densidad vectorial (porcentaje de viviendas positivas a larvas y recipiente) todas estas variables determinan la probabilidad y la intensidad de la transmisión.

2.5 CARACTERES CLINICOS

Dengue:

Las características clínicas de la fiebre del dengue dependen a menudo de la edad del paciente. Los lactantes y preescolares pueden sufrir una enfermedad febril indiferenciada con erupción maculopapular. Los niños mayores y los adultos pueden tener una enfermedad febril leve o bien la clásica enfermedad incapacitante de inicio abrupto, fiebre alta, cefalea intensa, dolor retroorbital, dolores musculares y articulares y erupción cutánea. Las hemorragias de la piel (con prueba del torniquete positiva, petequias o ambas) no son raras. Es frecuente la leucopenia y en ocasiones se observa trombocitopenia. La tasa de mortalidad es sumamente baja. Tabla No. 3

Muchas epidemias de fiebre del dengue se asocian a complicaciones hemorrágicas tales como epistaxis, hemorragia gingival, hemorragia gastrointestinal, hematuria e hipermenorrea.

Dada la variabilidad de las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por el virus del dengue, no es apropiado adoptar una definición clínica detallada que especifique los grados de fiebre y el número de criterios.

Debe recalcarse la confirmación de laboratorio.

2.5.1 Clasificación de casos

a) Probable: Enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones Figura No. 6:

- Cefalea
- Dolor retroorbital
- Mialgias
- Artralgias
- Exantema

b) Confirmado: caso confirmado por el laboratorio.

c) Notificable: todos los casos probables y confirmados deben notificarse a las autoridades sanitarias locales y nacionales como casos de dengue.

TABLA No. 3 DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES MAS FRECUENTES DEL DENGUE, DENGUE HEMORRAGICO Y OTRAS ENFERMEDADES

DENGUE

CLINICA:

- * Fiebre
- * Cefalea
- * Artralgias
- * Mialgias
- * Dolor Retroorbital
- * Malestar General
- * Eritema y/ o Exantema
- * Duración Promedio: 5-6 días

LABORATORIO:

- * Leucopenia con predominio linfocítico
- * Relación Hto / Hb Normal (3.2)

DENGUE HEMORRAGICO

CLINICA:

- * Además de lo anterior tiene que cumplir los 4 criterios de dengue Hemorrágico
- 1. Fiebre: aguda o reciente
- 2. Manifestaciones Hemorrágicas:
 - * Prueba de tomiquete positiva
 - * Petequias
 - * Equimosis
 - * Gastrointestinal
 - * Vaginal
 - * Sitios de Venipunción
- 3. Extravasación de Plasma: Evidencia por hemoconcentración y/o derrames.
- 4. Plaquetopenia: menor de 100.000

LABORATORIO:

- * Leucopenia con predominio linfocítico
- * Hematocrito elevado: más del 20% de lo normal o relación Hto. Hb mayor a 3.2.
- * Trombocitopenia <100.000
- * Rx. Ecosonograma: evidencia de derrames

DENGUE CON MANIFESTACIONES HEMORRAGICAS

CLINICA:

- * Lo anterior Más:
- * Manifestaciones Hemorrágicas leves:
 - * (Prueba de Lazo positiva, Petequias,
 - * Epistaxis)
- * Ausencia de Derrames
- * Buena Evolución

LABORATORIO:

- * Leucopenia con predominio linfocítico
- * Trombocitopenia Ocasional menor 100.000)
- * Relación Hto / Hb Normal (3.2)

SINDROME DE SHOCK POR DENGUE

CLINICA:

- * Lo anterior más:
- * Signos de Insuficiencia Circulatoria:
 - Piel Fría y Húmeda
 - Palidez
 - Hipotensión
 - Aproximación de T.A sistólica y diastólica.
 - Taquicardia
 - Llenado capilar lento
 - Muy mal estado general.

LABORATORIO

- * Leucopenia con predominio linfocítico
- * Hematocrito elevado: más del 20% de lo normal o relación Hto./Hb Mayor a 3.2
- * Trombocitopenia
- * PTT alargado

**CONTINUACION DE LA TABLA NO.3 DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES
MAS FRECUENTES DEL DENGUE, DENGUE HEMORRAGICO Y OTRAS
ENFERMEDADES**

SARAMPION

CLINICA:

- * Fiebre alta de 3 días de duración
- * Tos
- * Conjuntivitis
- * Manchas de Koplick
- * Erupción máculo papular a partir del tercer día de la fiebre, que respecta palmas y plantas.
- * Aprox. 14 días de evolución

COMPLICACIONES

- * Otitis
- * Neumonía
- * Diarrea
- * Encefalitis

LABORATORIO

- * Leucopenia

MENINGOCOCCEMIA

CLINICA:

- * Fiebre alta.
- * Malestar General
- * Exantema a las 24 horas aparece
- * Brote petequial. Equimosis
- * Aspecto séptico o de shock
- * Evolución Rápida: a la mejoría o a la muerte

SI HAY MENINGITIS:

- * Irritabilidad
- * Cefalea
- * Rigidez de Nuca
- * Vómitos
- * Convulsiones

LABORATORIO:

- * Leucocitosis con predominio de segmentado
- * Hematocrito normal
- * Plaquetopenia
- * PT alargado
- * GRAM de LCR o Hemocultivo (Diplococos GRAM negativo)

RUBEOLA

CLINICA:

- * Febrícula o fiebre no muy elevada
- * Exantema al segundo o tercer día de la fiebre.
- * Artralgias
- * Linfadenopatías Retroauriculares, Occipitales y Cervicales.
- * Aprox. 3- 5 días de evolución.
- * Poco toque del aspecto general.

COMPLICACIONES

- * Malformaciones congénitas.

LABORATORIO

- * Leucopenia
- * Trombocitopenia

EXANTEMA SUBITO

CLINICA:

- * Fiebre elevada (40 - 41° C)
- * No son raras las convulsiones
 - * Al 3-5 día cede la fiebre y

una erupción maculopapular eritematosa de 1 a 2 días de evolución.

- * Aprox. 3-5 días de evolución
- * Es más frecuente en niños de alrededor de un año de edad.

COMPLICACIONES:

- * Convulsiones en algunos casos

LABORATORIO:

- * No hay Leucopenia ni Trombocitopenia.

CONTINUACION DE LA TABLA NO.3 DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES MAS FRECUENTES DEL DENGUE, DENGUE HEMORRAGICO Y OTRAS ENFERMEDADES

**FIEBRE HEMORRAGICA
VENEZOLANA
(O DE GUANARITO)**

CLINICA:

- * Faringitis / Odinofagia
- * Tos
- * Neumonía
- * Vómitos
- * Diarrea
- * Deshidratación
- * Manifestaciones Hemorrágicas de cualquier tipo.
- * Alopecia Residual
- * Alta letalidad (30-40%)
- * Fiebre
- * Malestar General
- * Postración
- * Somnolencia
- * Cefalea
- * Mialgias
- * Artralgias
- * Conjuntivitis

LABORATORIO:

- * Leucopenia
- * Trombocitopenia

MALARIA

CLINICA:

- * Fiebre Alta Intermitente
- * Escalofríos
- * Sudoración Profusa
- * Mialgias
- * Cefalea
- * Astenia
- * Manifestaciones Gastrointestinales

LABORATORIO:

- * Muestra Hemática para:
 - Gota Gruesa
 - Extendido
- * Sin Linfocitosis
- * Eosinofilia

ELABORADO POR: Epidemiología Regional del Estado Aragua
Dra. Iris Villalobos de Chacón Maracay, Venezuela (36)

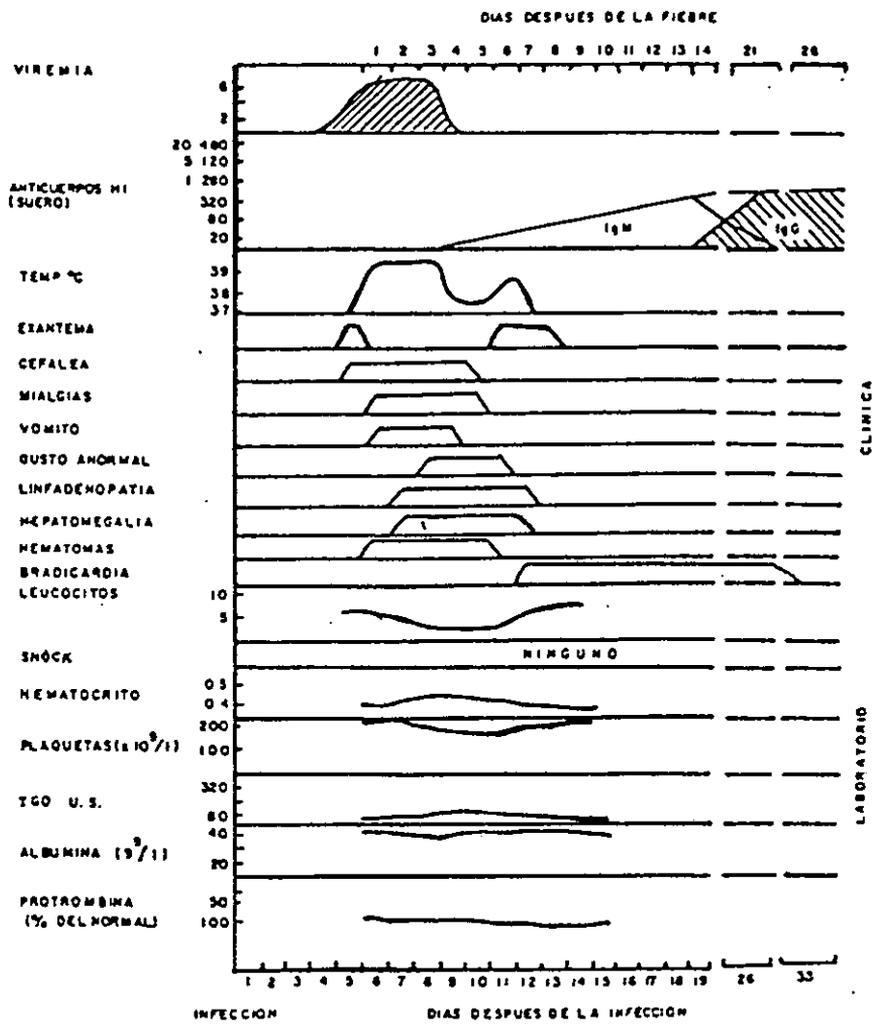


FIGURA NO.6 CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO DEL DENGUE CLASICO

Criterios de laboratorio para la confirmación: aislamiento del virus dengue a partir de muestras de suero o de autopsia, o demostración de un aumento cuádruplo o mayor en los títulos de anticuerpos de IgG o IgM contra uno o varios antígenos del virus del dengue en muestras séricas pareadas, o demostración del antígeno del virus del dengue en muestras de tejido obtenidas durante la autopsia o en muestras séricas mediante inmunofluorescencia o detección de ácido nucleico viral.

Definición de caso de fiebre hemorrágica del dengue (FHD) Figura No. 7

Todos los siguientes criterios deben estar presentes:

- 1.-Fiebre o antecedente reciente de fiebre
- 2.-Manifestación hemorrágica, evidencia por al menos una de las siguientes:

- a)Prueba del torniquete positivo
- b)Petequias, equimosis o púrpura.
- c)Sangramientos en las mucosas, tracto gastrointestinal, sitio de inyección u otra.

3.-Trombocitopenia ($100\ 000 \times \text{mm}^3$ o menos)

4.-Extravasación de plasma debida al aumento de la permeabilidad vascular manifestada por al menos uno de los siguientes elementos:

- a)Hematocrito menor al 20% por encima del promedio para esa edad y población.
- b)Disminución del 20% del hematocrito después del tratamiento.
- c)Signos asociados a la extravasación de plasma:
derrame pleural, ascitis o hipoproteinemia. (34,35)

2.5.2 Definición de caso clínico de síndrome de shock de dengue (SSD)

Los cuatro criterios antes expuestos más la evidencia de falla circulatoria manifestada por pulso rápido y débil, estrechamiento de la presión del pulso (tensión arterial diferencial de 20 mmHg o menos) o hipotensión arterial según los criterios para la edad, así como extremidades frías y confusión mental.

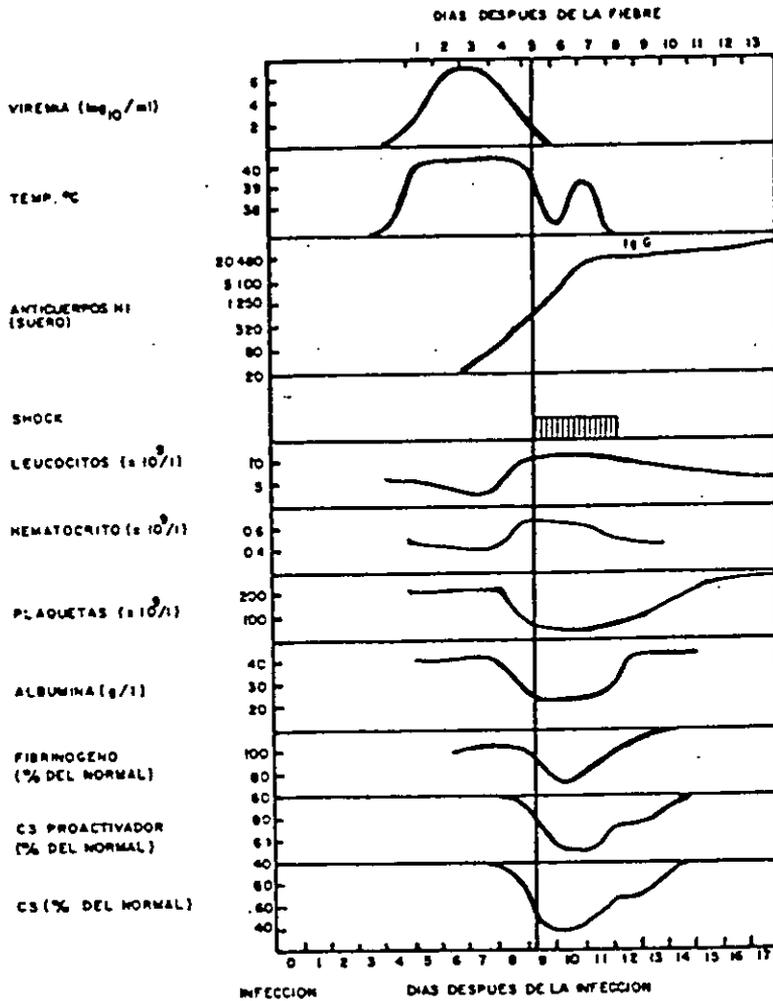


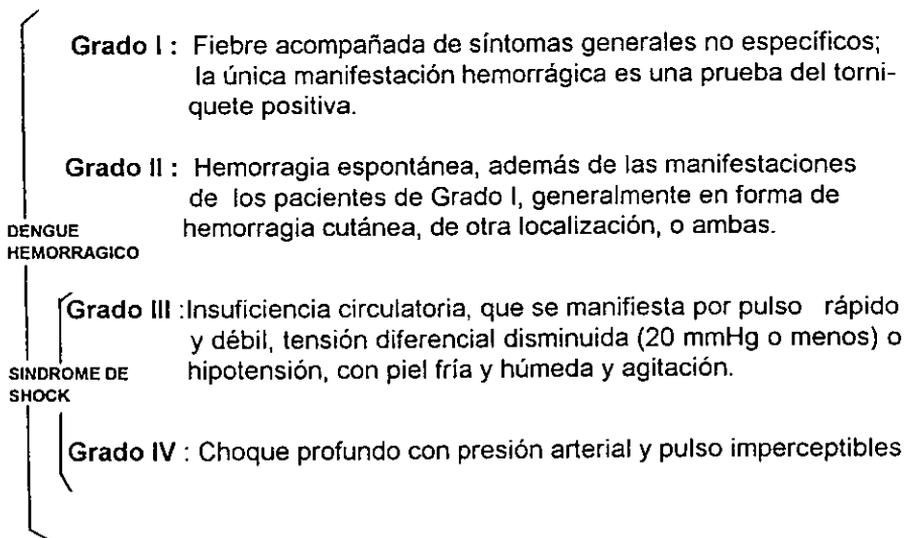
FIGURA NO.7 CARACTERISTICAS CLINICAS Y DE LABORATORIO EN DENGUE CON SINDROME DE SHOCK

2.5.3 Casos notificables de FHD o SSD: deben cumplirse los anteriores criterios y además uno de los siguientes:

- 1.-Evidencia virológica o serológica de infección aguda por dengue
- 2.-Antecedente de exposición a esta infección por estar o haber estado recientemente en área endémica o epidémica de dengue reconociendo que durante una epidemia o una endemia con niveles importantes de transmisión sea improbable que muchos casos tengan confirmación de laboratorio. (29)

2.5.4 Clasificación de la gravedad del dengue hemorrágico

La gravedad del Dengue Hemorrágico (DH) se clasifica en cuatro grados:



2.6 DIAGNOSTICO

En las infecciones primarias, el individuo afectado carece de anticuerpos específicos los cuales aparecen y aumentan paulatinamente en el curso de las primeras tres semanas de iniciado el cuadro febril.

Estos anticuerpos pueden detectarse por las técnicas de inhibición de la hemaglutinación (IH), de fijación del complemento (FC), de neutralización por reducción de placa y por ELISA, para determinar anticuerpos de la clase IgM muy al inicio de la enfermedad o de IgG a partir de las dos primeras semanas de iniciado el cuadro.(37,38)

2.6.1 Métodos Serológicos:

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

Para realizar la prueba de neutralización, se colocan juntos virus y suero bajo condiciones apropiadas se incuban y se inoculan a un sistema susceptible, en el cual la presencia del virus puede ser detectado. (39)

2.6.1.1 Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación:

Ciertos virus aglutinan los glóbulos rojos. La hemaglutinación (HA) es la unión de los eritrocitos producida por el virus o por alguna estructura del mismo. El resultado visible de la HA viral es un patrón formado en el fondo del pozo por los eritrocitos unidos por la hemaglutinina viral.

En la hemaglutinación directa, el virus actúa directamente sobre los eritrocitos y esta propiedad puede ser inhibida por anticuerpos específicos al virus. En el caso de los arbovirus la propia partícula viral es la hemaglutinina no existiendo enzima destructora del receptor.

Los anticuerpos de los diferentes arbovirus poseen una amplia reactividad de grupo por lo que la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) se utiliza para clasificar a los mismos en grupos antigénicos. (40,41,42)

2.6.1.2 Método de ELISA de Captura de IgM:

En la infección primaria por cualquier virus del complejo Dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que las muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del quinto día de establecimiento de la enfermedad.

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en numerosas enfermedades virales. Uno de los métodos aplicados es el de captura de IgM, utilizado para demostrar infecciones actuales o recientes. Para ello se emplea Inmunoglobulinas anti-IgM humanas las cuales se fijan a la placa.

La detección de anticuerpos IgM al virus dengue resulta de extrema utilidad tanto en el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos como en los sistemas de vigilancia epidemiológica para esta enfermedad. (42,43)

2.6.2 Métodos de Aislamiento:

El diagnóstico del dengue se puede hacer mediante el aislamiento viral. Los individuos infectados desarrollan una viremia suficiente para poder capturar al virus al inocular suero colectado en los primeros 5 días de iniciada la enfermedad, en las células susceptibles a la infección por denguevirus. (42,43)

2.6.2.1 Cultivo Celular:

Se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran las líneas celulares: Vero (riñón de mono verde), BHK-21 (riñón de hamsters), LLCMK-2 (riñón de mono rhesus).

En los últimos años se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus en comparación con los sistemas anteriores. Dentro de las más utilizadas se encuentran las células: C636 (*Aedes albopictus*), AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) y TRA-284 (*Toxorhichites amboinensis*). La elevada sensibilidad de estos sistemas, ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento.

Para el aislamiento del virus cada muestra sérica se inocula en una monocapa de tejido celular de la línea C₆₃₆ o TRA. Los cultivos se incuban a 28C° durante 8 ó 10 días dependiendo de la línea y pasando este tiempo son desprendidas las monocapas.

2.6.2.2 Inmunofluorescencia Directa e Indirecta:

En la técnica de inmunofluorescencia Directa (IFD) las moléculas proteicas de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de firmes enlaces químicos que no alteran esencialmente la actividad inmunológica de estos anticuerpos, manteniendo íntegramente su capacidad de unirse a los antígenos homólogos.

Una porción de células de cada cultivo se coloca en un portaobjeto, son fijadas y posteriormente teñidas con anticuerpos monoclonales para el grupo flavivirus, marcado con fluoresceína. (42,44)

El método indirecto el anticuerpo primario (no marcado) se añade sobre la muestra y el anticuerpo secundario (marcado) se combina con el complejo Ag-Ac primario. Si la fluorescencia es específica, se puede identificar el antígeno cuando se conoce el anticuerpo primario o viceversa. (45)

De las muestras positivas se preparan otras láminas las que son teñidas con anticuerpo monoclonal y posteriormente un anticuerpo fluoresceinado para identificación del serotipo.

2.6.3 Otros métodos de diagnóstico:

PCR:

El método de amplificación más utilizado actualmente es el que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Esta metodología, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), permite la rápida amplificación de material genético para su posterior análisis. (46)

La PCR se utiliza para amplificar un segmento de DNA que se encuentra flanqueado por dos regiones de secuencia conocida. La técnica está basada en el hecho de que las enzimas que realizan la síntesis de DNA requieren la presencia de un iniciador o " primer " para copiar la cadena que les sirve de molde y en que la capacidad del DNA de formar híbridos es dependiente de la temperatura: a altas temperaturas el DNA se " desnaturaliza" permaneciendo en la forma de cadena sencilla y al bajar la temperatura puede reasociarse formando híbridos.

En la PCR, a la DNA polimerasa se le suministran oligonucleótidos complementarios a las regiones que flaquean el fragmento que se desea amplificar y entonces, en ciclos sucesivos de síntesis, la polimerasa solamente podrá replicar la región flanqueada por los oligonucleótidos que van a servir como iniciadores de la polimerización.

El proceso es controlado mediante la temperatura: primero se calienta la muestra hasta alcanzar una temperatura, generalmente 94°C, que desnaturalice al DNA separando todas las cadenas; luego se permite el enfriamiento de la muestra hasta que los iniciadores se asocien con las secuencias que flaquean la región que se desea amplificar, generalmente entre 45 y 55 °C; finalmente se lleva la muestra a temperatura que permita la síntesis del DNA. Se utiliza para la síntesis una polimerasa termoestable (procedente de *Thermus aquaticus* o Taq polimerasa); esto tiene dos ventajas: por un lado las temperaturas de desnaturalización del DNA no inactivan a la enzima; y por el otro su elevada temperatura óptima de síntesis (72 °C) reduce la posibilidad de que los iniciadores formen híbridos débiles con otras regiones del DNA, lo que podrían dar lugar a eventos de amplificación inespecífica.

El proceso se repite y en cada nuevo ciclo las cadenas sintetizadas en el ciclo anterior sirven de molde para la síntesis de nuevas cadenas obteniéndose un crecimiento exponencial en el número de cadenas presentes en condiciones ideales partiendo de una sola copia de DNA podrían obtenerse alrededor de 1,000,000,000 de copias en treinta ciclos de síntesis.

Para seleccionar las secuencias de los iniciadores se utilizan los mismos criterios que para elegir la secuencia de la sonda en un procedimiento de hibridación directa, esto es, que sean secuencias específicas de la especie que se quiere diagnosticar o del gene que se quiere identificar.

La técnica de PCR ha tenido un impacto muy grande en el diagnóstico porque tiene una gran sensibilidad (puede detectar la presencia de hasta dos a tres copias de la secuencia buscada) y especificidad (si se escogen adecuadamente los iniciadores puede reconocer género especie y variedad); además de que nos permite tener los resultados en unas cuantas horas. (47,48,49,50)

2.7 VACUNAS

Desafortunadamente no se cuenta con una vacuna específica que proteja contra la infección por denguevirus. Un primer enfoque para obtener una vacuna protectora es identificar una cepa inocua de reacción cruzada.

Una segunda opción son las vacunas inactivadas, las cuales no han podido desarrollarse debido a problemas en lograr la multiplicación eficiente de los virus en cultivos celulares certificados.

La tercera posibilidad son las vacunas con virus atenuados, sin embargo las cepas de este tipo obtenidas en los últimos 15 años, frecuentemente han resultado excesivamente atenuadas, o al contrario no atenuadas.

En 1987 Angsubhakorn y col. hicieron un estudio de neurovirulencia del Den-1 en dos especies de monos del viejo mundo, *Macaca mulatta* (mono rhesus) y *Macaca fascicularis* (cinomólogo o mono verde africano). Un virus silvestre Den-1 y su correspondiente cepa vacunal fueron inoculados por vía intratálamica, intramuscular e intraespinal en ambas especies.

El resultado fue que hubo neurovirulencia, la respuesta de anticuerpos a los virus paterno y vacunal fue ligeramente menor en los rhesus que en los cinomólogos.

Una buena vacuna contra el dengue es que produzca niveles bajos de viremia en los vacunados y que no pase a mosquitos vectores naturales que pudieran alimentarse en estos sujetos, con la subsecuente transmisión a otros individuos de una cepa que posiblemente pudiera haber revertido a su estado silvestre.

Bancroft y colaboradores ensayaron la posibilidad de infectar mosquitos *Aedes aegypti* a partir de voluntarios que habían recibido experimentalmente una vacuna atenuada de Den-2. Únicamente dos de 114 mosquitos que tomaron sangre virémica se infectaron con el virus vacunal. La cepa recuperada de los mosquitos y de la sangre de los voluntarios retuvieron sus características fenotípicas. Este experimento demostró que el vector puede infectarse naturalmente con virus vacunal y que retiene in vitro sus características. (44,51)

En 1982 Miller y Beaty ensayaron una vacuna atenuada de Den-2 obtenida a partir de PR-159. Ambas cepas se compararon en su capacidad para infectar mosquitos y transmitirse.

El virus vacunal fue menos eficiente para infectar mosquitos, en tanto que el 14% transmitieron el virus. El virus vacunal permaneció sensible a la temperatura de 39°C después de infectar por vía oral y replicarse en *Aedes aegypti*.

Tren y colaboradores han trabajado en epidemiología molecular de los denguevirus. El mapeo y análisis computarizado de oligonucleótidos del RNA genómico de cientos de serotipos, han señalado que los patrones de cada serotipo son distintivos, reproducibles y que son mapeos similares a genomas virales de un solo serotipo, aislado en una epidemia en una región geográfica en particular. Gracias a estos estudios, se sabe que con la introducción del genotipo Jamaica en Puerto Rico en 1986 hay ya dos variantes Den-2 en América. Hasta ahora se conocen 15 variantes genotípicas del Den-2, siete del Den-1 y cinco del Den-3.

El conocimiento de las secuencias de los genes virales, deben ayudar a establecer las bases genéticas de los serotipos de denguevirus y establecer las diferencias entre flavivirus virulentos y atenuados, lo cual será la base de la preparación de vacunas. La clonación y secuenciación de la cepa Jamaica del Den-2 determinó que su RNA contiene un marcador de lectura de 10.2 kilobases. Estos estudios se continuaron en la aplicación de la ingeniería genética para obtener una vacunación recombinante en la cual la secuencia codificadora de las proteínas estructurales del Den-2 Jamaica se colocó en el virus de la vaccinia. Los cultivos celulares infectados con este recombinante sólo expresaron la proteína E y al inocularse en ratones o hamsters no produjeron anticuerpos detectables, pero al retarse con el virus Den-2 hubo una respuesta secundaria al virus, significando que si habían sido sensibilizados con el recombinante.

2.8 EPIDEMIOLOGIA

Panorama epidemiológico del Dengue y Dengue Hemorrágico en México. A finales de la Segunda Guerra Mundial los gobiernos de las naciones americanas acordaron, a través de la Organización Panamericana de la Salud, emprender una campaña sanitaria dirigida a erradicar del continente la fiebre amarilla. Gracias a esta campaña se logró la eliminación en casi todo el continente del *Aedes aegypti*, vector de dicho padecimiento y del dengue; en 1963 se declaró a México nación libre de dicho insecto. Sin embargo, cuatro años más tarde se volvió a detectar la presencia del vector.

En 1978 se presentó un brote de dengue clásico causado por el denguevirus-1 en la ciudad de Tapachula, Chiapas y poco tiempo después el padecimiento se había diseminado a todo el territorio nacional. Desde ese año y hasta el momento, 29 entidades federativas han reportado la ocurrencia de casos.

El padecimiento se ha presentado ininterrumpidamente desde 1978 hasta la fecha, en 1980 se presentó el mayor número de casos (51406), la tendencia ha sido a la disminución. **Figura No. 8** Por lo que toca al dengue hemorrágico (DH), el primer caso se presentó en 1984 en el estado de Yucatán. Durante el decenio 1984-1993 ocurrieron 26 casos, confirmados y compatibles, de dengue hemorrágico. En el año de 1994 se presentaron 30 (7 defunciones, tasa de letalidad de 23.3%) hasta la semana 47 de 1995 han ocurrido 266 casos (161 confirmados, 105 en estudio, 21 defunciones, tasa de letalidad de 7.89%) **Figura No.9**

En 1997 doce estados han reportado la ocurrencia de casos de dengue hemorrágico y en diez de ellos se han presentado defunciones. Los estados con la mayor tasa de letalidad son Guerrero, Oaxaca y Veracruz.

El patrón de comportamiento de los casos indica un incremento durante los meses de octubre, noviembre y diciembre para 1994; en relación con 1995 el aumento inicia desde el mes de agosto aun cuando han ocurrido casos a lo largo de todo este año. En 1996 se registraron 4,512 casos de Dengue Clásico. En 1997 se tienen registrados 22,934 casos de Dengue Clásico. **Tabla No. 4**

FIGURA NO. 8 CASOS DE DENGUE CLASICO. MEXICO, 1978-1995

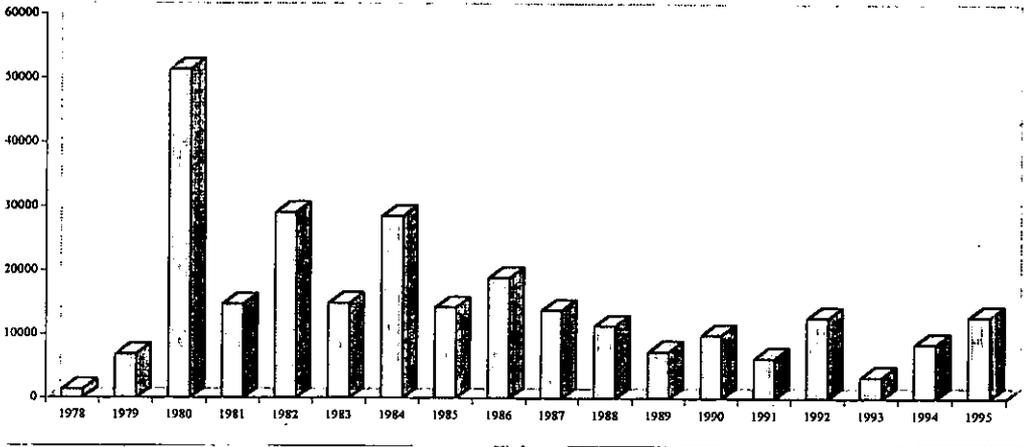
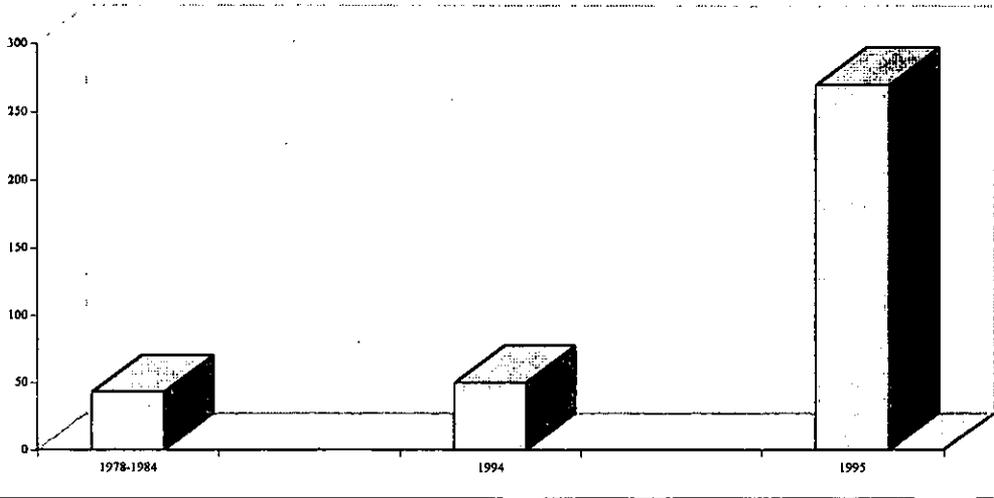
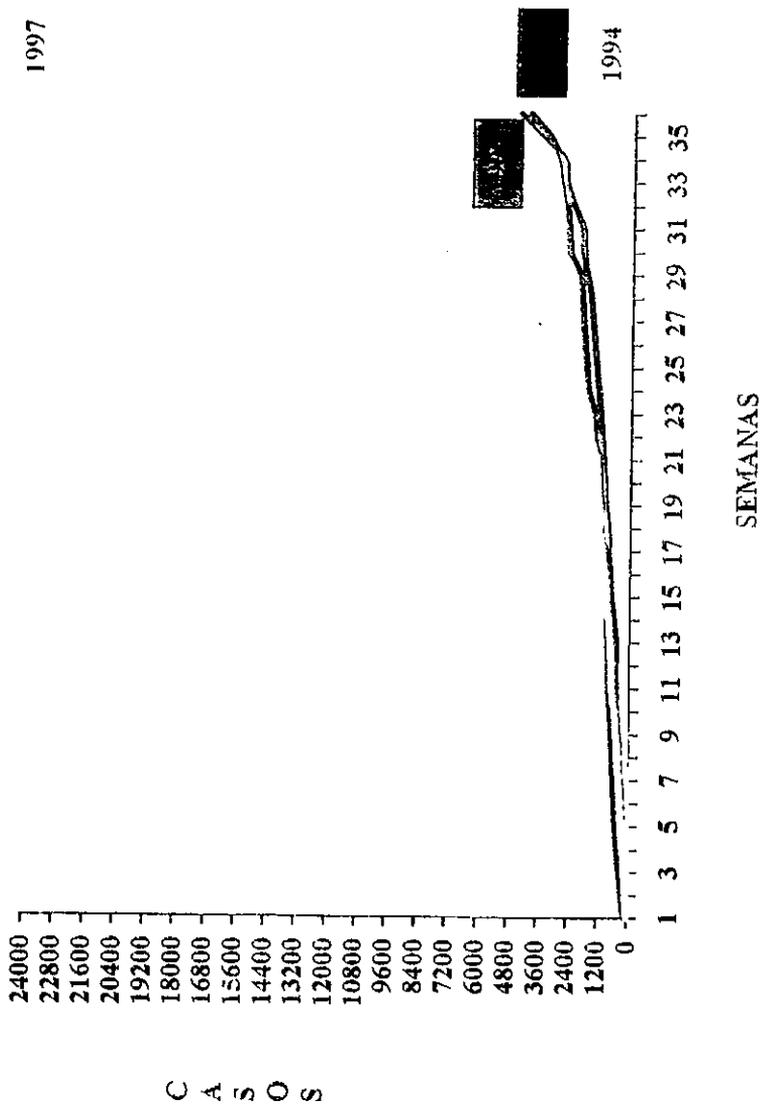


FIGURA NO. 9 CASOS DE DENGUE HEMORRAGICO. MEXICO, 1978-1995



**TABLA NO.4 CASOS DE DENGUE CLASICO ACUMULADOS POR SEMANA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 1994 -1997 ***



2.8.1 Vigilancia epidemiológica del dengue en México:

Los serotipos Den-1, Den-2 y Den-4 del denguevirus han circulado ampliamente en nuestro país desde principios de los años ochenta; el serotipo Den-3 no había estado presente en México durante los últimos 30 a 40 años, hasta su reciente aislamiento en septiembre de 1995 en los estados de Chiapas (Tapachula y Suchiapa) y San Luis Potosí (Ebano) y en octubre del mismo año en Veracruz (Jalapa) y en Tamaulipas. En 1996 se presentó en Oaxaca, Colima, Chiapas, Veracruz, Tabasco y Tamaulipas. En 1997 se localiza el serotipo Den-3 en Baja California Sur, Campeche, Coahuila, Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Morelos, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán.

La distribución geográfica del padecimiento nos muestra que éste predomina en áreas costeras, hacia la zona meridional del país, donde las condiciones ecológicas son favorables para la transmisión. La infección produce inmunidad permanente para el serotipo causal y cruzada por algunas semanas para los otros serotipos; la inmunidad de grupo, paradójicamente, es un factor importante de riesgo ante la introducción de un nuevo serotipo, como el Den-3 en nuestro país, que se ha asociado a epidemias de dengue hemorrágico en el continente.

No se conoce con exactitud la distribución y densidad de las distintas especies en el país, por lo que una de las prioridades del sistema de vigilancia es desarrollar mecanismos para conocer dichos aspectos, en particular porque estas especies han modificado su hábitat, al adaptarse con más frecuencia a altitudes mayores a 1200 msnm, y posiblemente a otras condiciones ecológicas, como se pudo demostrar en Taxco, Guerrero y Orizaba, Veracruz, donde se han documentado brotes de dengue clásico.

Dentro de los factores asociados a la presentación de formas hemorrágicas, destaca el antecedente de una infección por denguevirus, en especial si fue entre cinco y 10 años antes; asimismo, es importante la secuencia de los serotipos infectantes y la presencia de anticuerpos neutralizantes. Hasta el momento no se dispone de una vacuna efectiva ni de tratamiento específico para la enfermedad.

Dado el espectro y la fisiopatología de la enfermedad, el dengue clásico puede ser confundido con diversas infecciones virales (principalmente influenza y exantemáticas) o bacterianas. El dengue hemorrágico / dengue con síndrome de shock debe diferenciarse de sepsis, meningococemia, cuadros de abdomen agudo, púrpura trombocitopénica, hipermenorrea, metrorragia, fiebre tifoidea, cuadros clínicos de choque sin causa aparente, cirrosis hepática, neumonía, edema agudo pulmonar, cuadros infecciosos febriles o exantemáticos graves, así como neurológicos.

Los sistemas de vigilancia epidemiológica en salud pública tienen como objetivo determinar la frecuencia y distribución de la enfermedad en la población, conocer su magnitud e impacto, y establecer los grupos y áreas en mayor riesgo, con el fin de orientar las acciones de prevención y control.

El sistema nacional de vigilancia epidemiológica de dengue ha sido diseñado con el propósito de homogeneizar los procedimientos para la obtención, procesamiento y análisis de información sobre los factores de riesgo de la enfermedad. El producto del sistema proporciona información sobre los aspectos clínicos, la frecuencia y distribución del vector, los serotipos virales circulantes y la magnitud de los diferentes factores de riesgo para la enfermedad. (56)

La vigilancia epidemiológica del dengue, desde el punto de vista clínico, se basa en la utilización de las definiciones operacionales de caso, con el propósito de sistematizar y unificar los procedimientos diagnósticos para la detección, notificación, estudio, seguimiento y clasificación de casos. (53,54,55,56)

2.9 CONTROL

El propósito de un programa de control de dengue mediante la prevención se basa en el supuesto de que si se eliminan o reducen los ambientes propicios para la proliferación de larvas en el medio doméstico, se aminorará la densidad de hembras vectores a un nivel por debajo del cual no puede ocurrir la transmisión epidémica del virus.

Aedes aegypti rara vez se localiza en grandes densidades y se ha adaptado a las condiciones encontradas en el medio urbano tropical; habita en las viviendas y emplea una gran variedad de recipientes y ambientes naturales para depositar sus huevos. Estudios recientes demuestran que esta especie puede volar más lejos de lo que se pensaba y con frecuencia lleva a cabo ingestiones múltiples de sangre. El empleo de insecticidas ha desarrollado una mayor resistencia en la especie. Tales factores complican la tarea del personal de control de vectores para reducir la transmisión del virus detectada por el programa de vigilancia.

En el caso del dengue, el primer paso del proceso consiste en establecer un programa de vigilancia basado en pruebas de laboratorio, en el que el personal médico obtenga muestras apropiadas de pacientes con enfermedades similares al dengue, las almacene y las envíe a la brevedad a un laboratorio capaz de analizar las muestras para detectar anticuerpos antidengue o aislar el virus. Una vez en el laboratorio las muestras se procesarán y los resultados serán suministrados oportunamente a los médicos remitentes.

Antes de implementar un programa de vigilancia es necesario tomar decisiones respecto a cuáles miembros del equipo de salud (epidemiólogos, especialistas en control de vectores y promotores de salud, entre otros) deberán recibir información sobre la actividad del dengue y en que periodo. Este grupo debe transmitir la información adecuada al público a través de los medios masivos apropiados. Para que el programa sea efectivo y tenga las mejores posibilidades de éxito debe contar con un fuerte apoyo por parte de la Secretaría de Salud.

Si se desea que la comunidad participe es necesario educarla acerca de sus responsabilidades y de la importancia de su papel preventivo empleándose para ello al máximo sus propios recursos e ideas. (56,57,58,59,60)

El Programa a Nivel Mundial del 14 de mayo de 1993, la Asamblea Mundial de la Salud (AMS) aprobó la prevención y el control de dengue. Dicha resolución confirmó que la prevención y el control de la enfermedad debe estar entre las prioridades de la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como los países miembros a:

- Fortalecer programas para la prevención del dengue y la vigilancia de las poblaciones de vectores y casos en humanos.
- Concentrarse en medidas efectivas para reducir la densidad de vectores y transmisión de la enfermedad.
- Incrementar la capacidad de diagnóstico, así como fortalecer la vigilancia clínica y epidemiológica.
- Enfatizar un desarrollo urbano planificado que ofrezca suministros de agua seguros y confiables.
- Incrementar el personal entrenado y reducir la mortalidad de los casos mediante un mejor manejo clínico de los mismos.
- Fortalecer la investigación sobre la fisiopatología de las infecciones de dengue.
- Mejorar la educación comunitaria en materia de salud, promover prácticas de higiene e incrementar la conciencia y capacidad de acción de la comunidad.
- Facilitar las pruebas de campo para vacunas contra el dengue.

Además la Asamblea Mundial de la Salud (AMS) solicitó al Director General de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que:

- Establezca estrategias para prevenir la diseminación del dengue de un modo sostenible por los países miembros.
- Prepare planes para la cooperación de emergencia en caso de brotes de dengue para coordinar su implantación.
- Incremente la capacidad de la OMS para dirigir y robustecer la investigación sobre vigilancia, epidemiología y desarrollo de vacunas, así como para guiar a sus miembros en la prevención y el control del dengue.

-Coordine programas de prevención y control con otras dependencias de las Naciones Unidas, organizaciones de desarrollo, organizaciones no gubernamentales y otros grupos.

-Redoble esfuerzos para obtener recursos extrapresupuestales para apoyar actividades nacionales e internacionales de prevención y control

-Mantenga informada a la Mesa Ejecutiva de la AMS sobre la instrumentación de la resolución. (60,61,62,63)

2.10 TRATAMIENTO

No existe hasta el momento una vacuna que demuestre su eficacia contra los cuatro serotipos del virus dengue ni una droga antiviral de acción efectiva contra el mismo.

Se ha demostrado que el interferón alfa, administrado durante el comienzo de la enfermedad, es capaz de evitar la evolución hacia las complicaciones, pero este producto biológico no es aplicable masivamente, por razones de costo y disponibilidad. Tampoco se dispone de un anticuerpo monoclonal, u otro recurso moderno, para bloquear los mediadores que determinan el aumento de la permeabilidad vascular que conduce al choque.

No significa que no exista tratamiento para los enfermos con dengue y dengue hemorrágico: algunos lo han llamado tratamiento fisiológico intensivo. Consiste en actuar de manera inteligente, tratando de resolver cada complicación que aparece en un determinado momento. Diagnosticar y tratar precozmente el choque, así como evitar el edema pulmonar.

Para el médico: el dengue hemorrágico es una enfermedad autolimitada, que se produce por el derrame de mediadores y otras alteraciones, las cuales, casi todas, el organismo es capaz de resolver mediante otros mecanismos de compensación. El objetivo de todo el equipo médico y enfermeras es mantener vivo al paciente durante el número de horas o días necesario para que éste se estabilice y sobreviva.

2.10.1 Tratamiento durante la etapa febril (0-48 horas)

Tratamiento ambulatorio: Analgésicos (no aspirina por su acción antiagregante plaquetaria). Recomendar la ingestión de abundantes líquidos. Explicar a la familia las características de la enfermedad y los aspectos que deben observarse. La dosis de paracetamol no debe exceder de 90 mg/Kg/día para evitar su potencial hepatotoxicidad.

2.10.2 Tratamiento durante la etapa crítica (3°-5° día)

- 1.- Evolución Satisfactoria: igual tratamiento al anterior.
- 2.- Sangrados: tratamiento compresivo local si son discretos y las plaquetas mayor a 100,000 x mm³.

Si los sangrados son abundantes y las plaquetas están por debajo de $100,000 \times \text{mm}^3$, considerar la transfusión de plaquetas (si la hemoglobina y el hematocrito estan en niveles anormales) pudiera utilizarse sangre fresca en el raro caso en que las hemorragias hubiesen sido tan intensas como para hacer descender las cifras de hemoglobina y hematocrito.

3.-Colecciones serosas (hidrotórax, ascitis): si son bien tolerados, conducta expectante.

4.-Signos de alarma: dolor abdominal intenso y mantenido, vómitos frecuentes y abundantes, irritabilidad y/o somnolencia, descenso brusco de la temperatura (de fiebre a hipotermia) con sudoración abundante, adinamia y a veces lipotimia.

Los signos de alarma son signos de la enfermedad que anuncian la inminencia del choque. Canalizar vena e iniciar la administración de líquidos (cristaloides) por vía intravenosa. La cantidad de líquidos sera la que requiera cada paciente para compensar sus pérdidas. Comenzar por $1500 \text{ ml} \times \text{m}^2$ de superficie corporal x día, sobre todo si se conserva la vía oral. La calidad de la solución puede ser Lacto-Ringer o mejor Acetato-Ringer o dextrosa al 5%, con distintas mezclas de cloruro de sodio según la edad del paciente.

5.- Choque: tratamiento del choque hipovolémico tal como cada hospital lo tiene determinado para pacientes con este tipo de choque por otras causas, por ejemplo para el choque por la gastroenteritis o el cólera. Con una diferencia: administrar solamente la cantidad de líquido necesaria para mejorar las condiciones hemodinámicas del paciente, porque en el dengue hemorrágico las cantidades de agua y electrolitos únicamente se han extravasado y no eliminados al exterior y por lo tanto retornarán al espacio intravascular.

Si el choque se hace prolongado o recurrente y se extiende más de 12 a 24 horas, reducir el volumen de líquidos que se administran a la cantidad imprescindible para mantener la diuresis en $30 \text{ ml/ m}^2/\text{hora}$, con el objeto de hacer prevención del edema pulmonar. Evitar la cianosis a toda costa, administrando adecuada cantidad de oxígeno.

En el tratamiento del choque puede incluirse las soluciones coloides (albúmina humana, plasma, dextrán) pero exclusivamente cuando se requiera una rápida recuperación de la tensión arterial aumentar la volemia y mejorar la microtitulación.

La utilización exagerada de dichas soluciones coloides puede contribuir a las complicaciones pulmonares señaladas. El dextrán pudiera interferir con la función de las ya disminuidas plaquetas, por lo que no es recomendable su empleo si hay hemorragia digestiva. Es por esto que debemos depender fundamentalmente de cristaloides en el tratamiento del choque por dengue.

De acuerdo con la fisiopatología del choque en esta enfermedad, producida por aumento de la permeabilidad vascular a causa de la acción de mediadores (no existen vasculitis ni daño demostrable a la célula endotelial) es innecesaria la utilización de los fármacos empleados en otros tipos de choque (séptico, cardiogénico, etc) No se recomienda el uso de corticoides por considerarlos innecesarios y potencialmente peligrosos; lo dicho se basa en la experiencia de no haberse empleado en muchos casos tratados con éxito durante la epidemia de Cuba y varias de América del Sur, las cuales evolucionaron bien por la vía del tratamiento de reposición de líquidos solamente. Además, con los corticosteroides existe el peligro de favorecer las hemorragias del tracto digestivo, entre otros efectos indeseados.

No se recomienda hacer uso de la heparina. La coagulación intravascular diseminada (CID) no es frecuente en esta enfermedad y es posible resolverla mediante la administración precoz y adecuada de líquidos por vía intravenosa.

El tratamiento de cualquier paciente en choque es muy dinámico y corresponde al médico que lo atiende (preferentemente en una Unidad de Cuidados Intensivos) tomar las decisiones que cada caso requiera.

Choque con edema pulmonar: disminuir aún más los líquidos intravenosos. Si hay disnea o pO_2 de 60 mm/Hg ventilación mecánica. Esta combinación de choque y distress respiratorio por edema pulmonar no cardiogénico constituye la situación más difícil de un terapeuta debe afrontar al tratar un enfermo con FHD/SSD.

El mayor esfuerzo, debe ser hecho para prevenirlas. El paciente puede sobrevivir mediante un control preciso del balance de líquidos (ingresos y pérdidas), la monitorización de las funciones vitales y todas las acciones médicas y de enfermería que requiere este tipo de paciente crítico.

En la etapa de recuperación, cuando ya desapareció el choque y la volemia es normal o aumentada, puede mantenerse algún signo de estasis pulmonar. El paciente previamente sano y normal deberá eliminar este exceso del líquido de manera espontánea mediante la diuresis. (29,35,43,54)

2.11 CITOMETRIA DE FLUJO

2.11.1 HISTORIA:

La Citometría es definida como la medición de las características morfológicas de células u otras partículas biológicas. Las mediciones son hechas cuando las partículas pasan en línea en una corriente líquida a través de un rayo láser. (64)

El antecedente histórico más remoto corresponde a Lomonosov quien en 1742 inventó un sistema de flujo para medir partículas en hidrosoles y aerosoles, lo que se denominó después efecto Tyndall, anticipándose al microscopio de campo oscuro y a la medición de partículas submicroscópicas por esparción de un haz de luz.

En este siglo xx, en la década de los años 30, Moldavan describe intentos sin tener éxito para contar células que circulaban a través de un tubo capilar.

El contador de partículas de Gucker, utilizado en la II Guerra Mundial y en la Escuela de Medicina de Harvard para la medición de bacterias y esporas del medio ambiente, trabajaba con una de las más potentes fuentes de luz que se conocía, el faro de un automóvil Ford. Siguiendo a Gucker, el principio del sistema de corriente de fluidos fue adoptado por Crosland-Taylor y varias industrias en el desarrollo de aparatos para contar células sanguíneas.

El sistema Coulter está basado en que la conductividad eléctrica de las células que pasan por un orificio pequeño, es más baja que las de las soluciones salinas usadas como diluyente y esto puede detectarse por el cambio de la impedancia eléctrica en el orificio al momento de pasar. El primer orificio que hizo Coulter, fue hecho en papel celofán de una envoltura de cigarrillos.

La diferenciación entre glóbulos rojos y leucocitos fue hecha por Kosenov con el uso de naranja de acridina. Los pulsos de marcaje al comparar un glóbulo rojo que no se teñía, con los leucocitos permitió una clara diferencia.

Los aparatos que precedieron a los modernos equipos de Citometría de Flujo, fueron los de Kamenstsky quien midió el contenido de los ácidos nucleicos y el tamaño celular por esparcimiento del haz de luz y el seleccionador celular de Fulwyler que utilizó el principio del impresor de tinta de chorro.

Se han agregado sensores ópticos y electrónicos a los primeros equipos de citometría. Los modernos citómetros de flujo para investigación aparecieron en los años 70 y utilizaron helio, neón y argón como fuentes de luz.

En 1972 el grupo de Herzenberg en Stanford desarrolló una versión mejorada de su seleccionador celular. Fue el primer equipo que pudo detectar señales fluorescentes de células que habían sido marcadas con anticuerpos conjugados a fluoresceína y rodamina. (65)

La selección de células marcadas con fluorescencia fue desarrollada en la década de los años 70. Para estudiar poblaciones de células aisladas para inmunología.

El instrumento original fue grande, conteniendo un potente láser, este fue refrigerado por agua, capaz de analizar y clasificar las células.

Además la Citometría de Flujo continúa para función del campo de la inmunología, ésta es usada en otros campos como la biología celular, la biología molecular, la patología y el diagnóstico microbiológico que está aumentando.

Con la expansión del uso de la Citometría de Flujo, para estudios que no requieren la capacidad de selección celular para un instrumento FACS. La maquinaria ha sido simplificada a más compacta, aire-frío, láser solo, instrumento analítico. Durante los análisis, el ensayo es contenido dentro del instrumento. Usando solo un rayo láser que permite emitir la medición cuantitativa para un número de propiedades celulares, incluyendo número de células, el tamaño de las células, granularidad celular y por arriba de tres diferentes fluorocromos por célula.

Además para el número de células clasificadas por fluorescencia, la cantidad de cada fluorocromo asociado con cada célula podría ser medido por la Citometría de Flujo.

El Citómetro de Flujo puede analizar varios miles de células por segundo, es posible analizar un número satisfactoriamente significativo de células en un tiempo corto. Los citómetros de flujo modernos con una óptica fija y una computadora interna permite al operador fijar parámetros para varios análisis con facilidad y guardar estos parámetros en la computadora para recuperarlos cuando se necesiten. (66)

La Citometría de Flujo es una potente herramienta para el análisis de células sanguíneas. En la clínica la metodología se divide en técnicas de investigación y de rutina. Estas últimas son la inmunofenotipificación de linfocitos, la cuantificación de DNA y el recuento de reticulocitos entre otros. Estos procedimientos proporcionan información muy valiosa tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los cambios ocurridos en el sistema inmune por ejemplo del sujeto HIV+.

El Citómetro de Flujo analiza poblaciones celulares en un tiempo muy corto, de 1000 a 10 000 células por segundo en promedio.

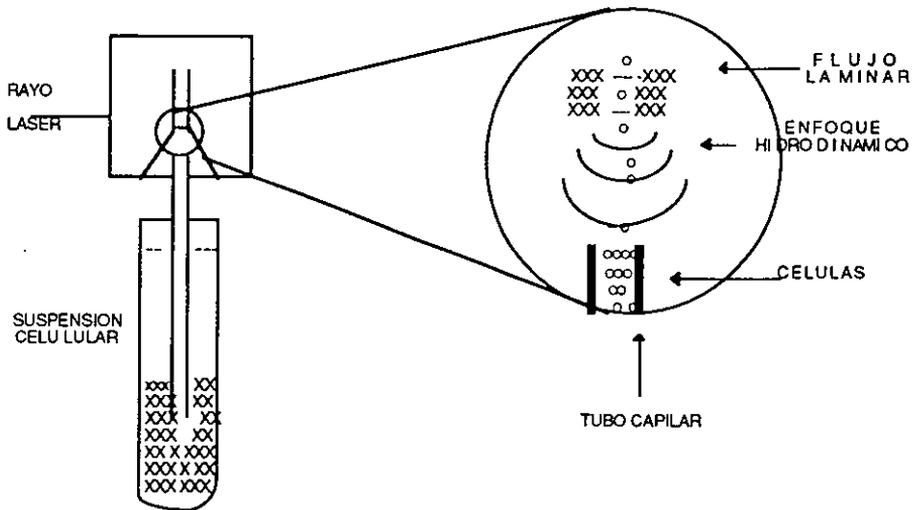
La Citometría de Flujo es una técnica que permite la medición simultánea de varias características en una sola célula, por ejemplo tamaño, granularidad y fluorescencia. Para esto el equipo de citometría utiliza sistemas ópticos, de fluidos y electrónicos. Los datos sobre estas características celulares son analizados posteriormente por medio de los sistemas de cómputo. Para analizar las células en el equipo de Citometría de Flujo, deben estar en suspensión y se hacen pasar por un sistema diseñado de tal manera que se logra un flujo laminar en un enfoque hidrodinámico.(67)

Las células se localizan en el centro del fluido y así interactúan con un rayo láser, modulado por una serie de lentes. El láser tiene su origen en una fuente incandescente de argón. Cuando el rayo láser encuentra presente alguna molécula fluorescente, la señal es incrementada. La luz dispersada y la luz fluorescente son colectadas por lentes colocados en posiciones adecuadas. Una combinación de filtros y lentes dirigen las luces dispersada y fluorescente a los detectores. Los detectores producen una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz que incide sobre ellos. Los datos generados son recolectados para cada una de las partículas o eventos y las características o parámetros que se miden para cada uno de ellos se basan en sus propiedades de dispersión de la luz y fluorescencia. Los datos recolectados se guardan en la computadora, donde puede analizarse para dar información acerca de las subpoblaciones celulares de la muestra sanguínea. (68)

2.11.2 SISTEMA DE FLUIDOS:

Los constituyentes de un sistema de fluidos en el citómetro se usan para colocar las partículas de la muestra en el centro del rayo láser. Para lograr esto, la suspensión concentrada de partículas se inyecta a una corriente libre de partículas llamado líquido de envoltura, el cual rodea a la suspensión celular. El compartimiento de flujo celular, por donde circulan las células, está diseñado de tal manera que el flujo laminar sea estable. Esto significa que la corriente de la muestra permanece separada, pero en posición coaxial dentro del líquido de envoltura. El flujo de este líquido se acelera y atenúa la suspensión, causando que las partículas se localicen en el centro del fluido en un proceso llamado enfoque hidrodinámico. Figura No.10

FIGURA NO. 10 FLUIDO LAMINAR Y ENFOQUE HIDRODINAMICO



2.11.3 SISTEMA OPTICO:

Láser con las siglas de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación). El rayo láser producido por el argón y por la lámpara de mercurio son los dos tipos de fuentes luminosas más ampliamente usados en la Citometría de Flujo. La ventaja del rayo láser es su estabilidad y la capacidad de enfocarlo al tamaño de la célula. (66)

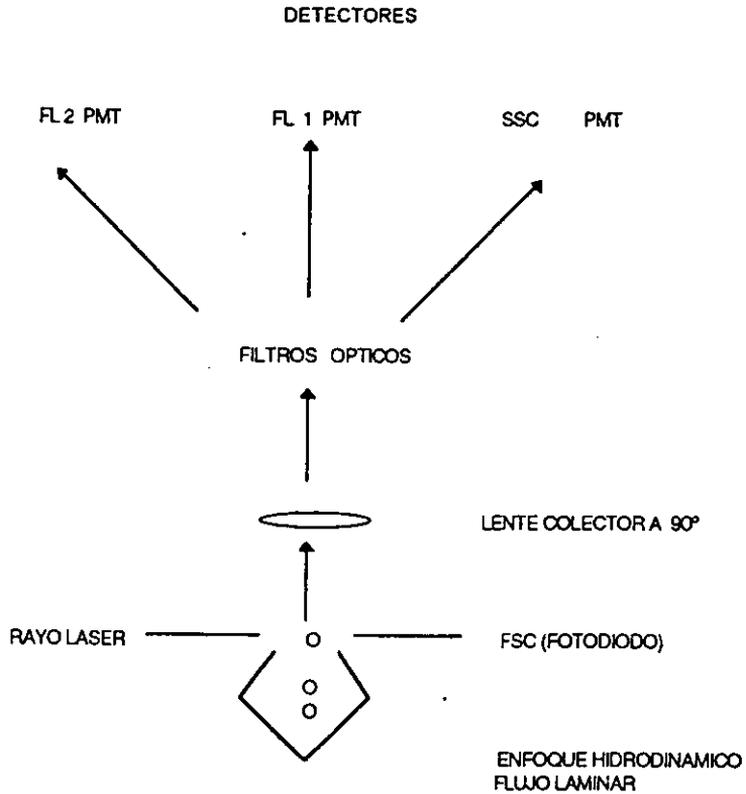
La dispersión de la luz se presenta cuando una partícula refleja la luz que incide sobre ella. La magnitud a la cual esto ocurre, depende de las propiedades intrínsecas de la partícula, principalmente su tamaño y densidad. Los componentes de una célula que contribuyen a la dispersión de la luz son: la membrana, el núcleo y el material granular interno de la célula. La forma de la célula y la topografía de su superficie (rugosidad, lisura) también contribuyen en este proceso.

La luz dispersada en la misma dirección del rayo láser se llama luz dispersada hacia el frente (FSC, de forward light scatter), la cual es proporcional al área de superficie celular y detectada en la misma dirección en la que viaja el rayo láser incidente. La señal FSC es generalmente fuerte y fácilmente detectable por un fotodiodo simple.

La buena resolución de la señal FSC requiere que las partículas estén bien localizadas en el centro del flujo de la muestra y que el punto focal del rayo láser (determinado por la posición de los lentes de enfoque) esté localizado en la parte central del flujo.

Una segunda señal de la dispersión de la luz se recolecta a 90° con respecto al rayo láser. A ésta se le conoce como luz dispersada hacia los lados (SSC, de side scattered light). La señal SSC varía en proporción a la estructura interna y la granularidad de la partícula. Un conjunto de lentes localizados a 90° del rayo láser intercepta y enfoca la luz, la cual es dispersada y dirigida hacia detectores adecuados. Figura No.11

FIGURA NO. 11 COMPONENTES OPTICOS DEL CITOMETRO



PMT= TUBO FOTOMULTIPLICADOR
FL 1 = FLUORESCENCIA 1
FL 2 = FLUORESCENCIA 2

La correlación de las señales FSC y SSC permite la discriminación de los diferentes tipos celulares dentro de una población celular heterogénea, sirviendo para identificar principalmente subpoblaciones de leucocitos en la sangre humana.

2.11.4 MARCADORES:

En la citometría de flujo se emplean anticuerpos monoclonales conjugados a compuestos fluorescentes. Los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa dentro de los límites de longitud de onda que son característicos para cada uno de los compuestos. Esta absorción causa que un electrón suba a un nivel mayor de energía. Este electrón regresa a su estado basal emitiendo en diferente longitud de onda un fotón como una liberación del exceso de energía.

Los límites dentro de los cuales un compuesto fluorescente puede ser excitado, es conocido como su espectro de absorción. Debido a que se consume mayor energía en la transición de absorción que en la de la emisión de la fluorescencia, las longitudes de ondas emitidas serán más grandes que las de absorción. Estas longitudes de onda emitidas forman el espectro de emisión.

La señal fluorescente generada debe ser proporcional a la cantidad de colorante que está presente sobre la partícula. Esto requiere que para un colorante dado se use una longitud de onda de excitación adecuada. También se necesita que se usen fluorocromos diferentes, se seleccionen cuidadosamente de tal manera que la fluorescencia de uno pueda ser discriminada de la de los otros.

Los equipos los agrupan en canales de fluorescencia, F1, F2 y F3. Si el rayo láser como fuente luminosa es originado en argón, debe elegirse fluorocromos que sean excitados a 488 nm.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el fluorocromo más comúnmente empleado, cuyo máximo de absorción está cerca de los 488 nm.

Para detectar las señales de fluorescencia en el citómetro, se emplean tubos fotomultiplicadores (PMT), los que responden a una amplia gama de longitudes de onda. Estos tubos fotomultiplicadores detectan y amplifican señales débiles de luz.

En el citómetro de flujo se usan fotodiodos para detectar las señales FSC y tubos fotomultiplicadores sensibles para detectar las señales SSC y de fluorescencia.

Un tubo fotomultiplicador (PMT) responsable de la detección de una señal de fluorescencia debe detectar solamente la luz asociada con el colorante fluorescente.

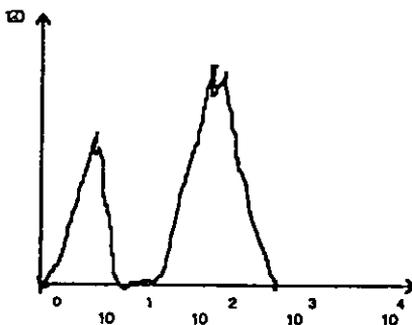
La especificidad de un detector para cada uno de los colorantes puede hacerse óptima colocando un filtro enfrente de cada tubo fotomultiplicador, el cual permite el paso de una banda reducida del espectro cercano al pico de emisión del colorante.

Un lente que separa el haz es responsable de dirigir las diferentes luces hacia dos direcciones distintas. Los fotones con longitud de onda mayor de 560 nm se dirigen hacia el tubo fotomultiplicador FL2 mientras que se trasmite la luz de longitud de onda más corta hacia el tubo fotomultiplicador FL-1.

Una vez que las señales luminosas son detectadas, se convierten a pulsos electrónicos proporcionales a la intensidad de la luz incidente, los cuales son analizados y después convertidos a señales digitales que se guardan en la computadora como información de datos.

Los perfiles de intensidad se representan como histogramas, en donde el eje horizontal representa la población de eventos que tienen más fluorescencia. Se cuantifica en canales de fluorescencia y está colocada en forma lineal en una escala de 0-250 canales (dependiendo del tipo de equipo) y en forma logarítmica de 10^0 hasta 10^4 Figura No. 12. Cada evento se coloca en el canal que corresponde a su intensidad. Las señales con intensidad idéntica se acumulan en el mismo canal. Los eventos con señales con mayor fluorescencia se colocarán en canales que se encuentren hacia la derecha, aquellos con señales menores se colocarán en canales colocados hacia la izquierda.

FIGURA NO. 12 HISTOGRAMA DE FLUORESCENCIA



Los datos o la información que el citómetro produce pueden presentarse en cuatro diferentes formatos: histogramas de frecuencia (side by side), diagrama de puntos (dot-plot), diagrama de contornos (contour plot) y diagrama tridimensional (isometric). Se selecciona dependiendo de cómo se quiera presentar los datos o hacer resaltar alguna información en particular.

El más empleado en investigación es el histograma de frecuencia (side by side) porque permite colocar cada uno de los eventos en rangos o canales, en el eje horizontal de las abscisas x dependiendo de la intensidad de la característica de la muestra sanguínea que se evalúa. Cercano al origen en el lado izquierdo, se colocan los eventos que tienen una menor intensidad de fluorescencia y hacia la derecha de la pantalla los de mayor intensidad. Si la población es uniforme en fluorescencia, la base del histograma será estrecha, si no es uniforme será más amplia, además si hay varias poblaciones se apreciarán varios histogramas.

3.- JUSTIFICACION

El dengue es una enfermedad que cada vez infecta a más personas y ocurre sobre todo en época de lluvia y después de ésta cuando los mosquitos *Aedes aegypti* proliferan en áreas donde se encuentran depósitos de agua estancada.

En México solo habían circulado los serotipos Den-1, Den-2, y Den-4 lo cual ha afectado a 29 localidades federativas hasta agosto de 1995; y Den-3 en el estado de Chiapas municipio de Suchiate a principios de agosto de 1995. El diagnóstico de dengue se realiza por las técnicas de ELISA, Inhibición de la hemaglutinación, Cultivo Celular y por Inmunofluorescencia. Estas técnicas se producen en laboratorios con una infraestructura desarrollada ya que requieren de un material costoso como: estufa, campana de flujo laminar, microscopio de luz ultravioleta, reactivos y de tiempo.

Por tal motivo se pretende introducir y aplicar una técnica rápida y eficiente que apoye el diagnóstico de dengue a nivel laboratorio y sobre todo en el campo cuando se encuentre un brote epidemiológico en cierta parte del país.

4. OBJETIVOS

Estandarización de la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar y Citometría de Flujo para Dengue.

a.- Llevar a cabo una prueba en donde los antígenos específicos del Dengue se acoplarán a los glóbulos rojos de carnero tratados previamente con ácido tánico y a los glóbulos rojos de ganso produciendo una aglutinación con anticuerpos presentes en sueros de pacientes.

b.-Realizar la estandarización por Citometría de Flujo para detectar el virus adherido a la superficie de los glóbulos rojos de ganso y carnero, que serán separados de acuerdo a la intensidad de fluorescencia comparados con los testigos sin antígeno.

c.-Realizar un diagnóstico rápido y eficaz en sueros de pacientes con Dengue utilizando la técnica de la Hemaglutinación Pasiva en Capilar.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 MATERIAL:

A) Biológico:

- 1.-Sueros de pacientes positivos y negativos a dengue enviados al laboratorio de virología del I.N.D.R.E.
- 2.-Sueros de pacientes positivos a otras enfermedades diferente a Dengue: tuberculosis, cisticercosis, hepatitis, herpes, citomegalovirus, sarampión, rubeola, varicela, citomegalovirus, del I.N.D.R.E.
- 3.-Glóbulos rojos de ganso y carnero que son proporcionados por el bioterio del I.N.D.R.E.
- 4.-Anticuerpo Anti-IgM humano. Lab. Kirkegaard y Ferry. Laboratorios Inc.
- 5.-Anticuerpo monoclonal anti-flavivirus conjugado con enzima peroxidasa. (proporcionado por los laboratorios CDC)
- 6.-Albúmina Bovina Fracción V
- 7.-Suero Normal Humano al 15 %
- 8.-Anticuerpo monoclonal anti-flavivirus conjugado a fluoresceína
- 9.-Anticuerpos monoclonales: anti-Dengue 1, anti-Dengue 2, anti-Dengue 3, anti-Dengue 4 conjugado a fluoresceína.

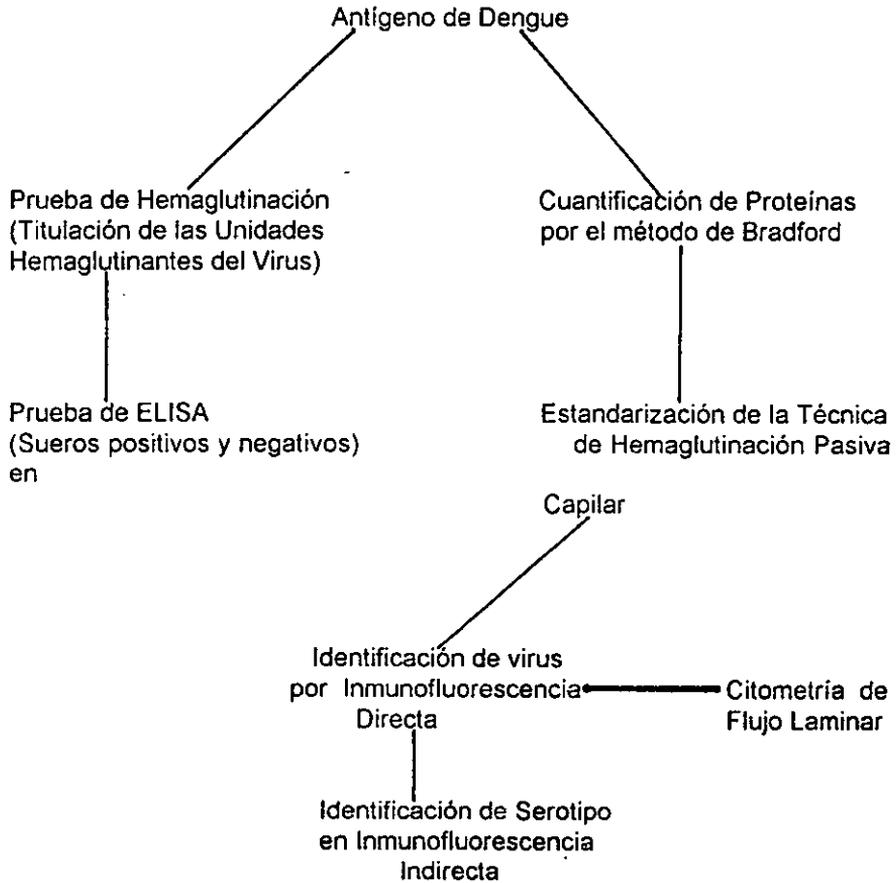
B) Material de Laboratorio:

- 1.-Microplacas de Alta adherencia para ELISA (ELA-RIA fondo plano de 96 pozos)
- 2.-Papel sellante para microplaca costar de 100 pzas.
- 3.-Microtubos para dilución de muestra con soporte esterilizables
- 4.-Tubos capilares sin heparina
- 5.-Tubos de 6 ml (12 x 75 mm de poliestireno, fondo redondo con tapa) estériles. Becton Dickinson.

C) Aparatos:

- 1.-Centrifuga refrigerada (DAMON IEC, CO. DPR 6000)
- 2.-Lector de Placas de ELISA (Dynatech MR 5000)
- 3.-Impresora de lector de ELISA (Epson LX-810)
- 4.-Microscopio de inmunofluorescencia (Zeiss)
- 5.-Citómetro de Flujo Becton Dickinson

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL



5.3 PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

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

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

A) PREPARACION DE GLOBULOS ROJOS DE GANSO:

Se utilizan glóbulos rojos de ganso porque en la superficie se encuentran receptores que tienen afinidad por el antígeno viral. Los receptores en la membrana del glóbulo rojo son mucoproteínas terminales con ácido siálico.

- 1.-Sangrar en condiciones de asepsia a partir de la vena del ala, con una jeringa desechable con aguja del número 20 conteniendo 1.5 ml de solución de Alsever's por cada 8.5 ml de sangre.
Los gansos no deben sangrarse más de una vez a la semana para evitar anemias.
- 2.-Filtrar en gasa estéril para eliminar la presencia de coágulos.
- 3.-La sangre se lava con solución dextrosa-gelatina-veronal (DGV) en un tubo para centrifuga.
- 4.-Se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos.
- 5.-El paquete se resuspende en solución de DGV de modo que resulte una suspensión al 8%.
- 6.-A partir de esta suspensión, se prepara otra suspensión de glóbulos rojos 1:24 usando como diluyente los PBS's de pH's diferentes (6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 y 7.0).

B)TITULACION DE LAS UNIDADES HEMAGLUTINANTES DEL VIRUS:

- 1.- Es importante determinar el pH óptimo de hemaglutinación de cada uno de los virus por utilizar.
- 2.-Se usa una placa para cada serotipo de dengue.
Se marca en el sentido horizontal las diluciones del virus y en el sentido vertical los pH de las diferentes soluciones de fosfatos en las que están diluidos 1:24 los eritrocitos de ganso estandarizados.

3.-En la primera columna vertical se colocan 0.1 ml (100 μ L) de la suspensión viral correspondiente a la placa que se está usando.

4.-Se colocan 0.05 ml (50 μ L) de la solución albúmina bovina (BABS) al 0.4% en los pozos vacíos de la placa.

5) Con la ayuda de una pipeta multicanal graduada a 0.050 ml (50 μ L) se realizan las diluciones, pasando del primer pozo al segundo y a través de todos los pozos restantes. Descartar los 50 μ L del antepenúltimo pozo. En las dos últimas hileras de la placa se colocan los testigos.

6.-En todos los pozos se depositan 0.05 ml (50 μ L) de la suspensión estandarizada de eritrocitos diluída 1:24. En cada hilera deberán usarse un solo pH, hasta completar los 6 valores de pH previstos (6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 y 7.0). **Fig. No.13**

7.-En los pozos de los testigos se incluyen las 6 suspensiones de eritrocitos y del diluyente solo.

8.-Agitar las placas, se cubren y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.

9.-Se busca la presencia de hemaglutinación, es decir la formación de agregados de eritrocitos que se depositan esparcidamente en el fondo del pozo como una malla. Los eritrocitos no aglutinados se depositan en el fondo del pozo en forma de un punto o botón.

10.-En el último pozo donde se observe hemaglutinación completa será una unidad hemaglutinante (UHA).

11.-El pH óptimo corresponde a aquel en donde se encuentre el mayor título del virus, es decir donde haya el número mayor de UHA.

12.- Para la prueba de inhibición de la hemaglutinación se prepara la dilución del antígeno que contenga de 4 a 8 unidades hemaglutinantes (UHA).

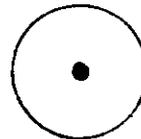
1UHA= la más alta dilución del antígeno que muestra una hemaglutinación completa.

Interpretación: Patrones de Hemaglutinación

Hemaglutinación Completa

Hemaglutinación Parcial

Hemaglutinación negativa



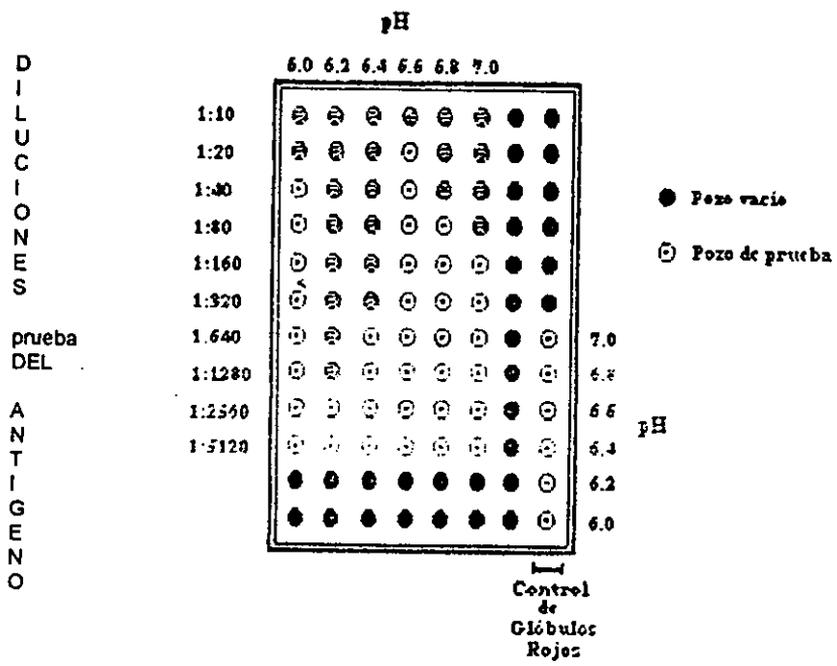


FIG. No. 13 PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (Titulación de antígeno)

5.4 METODO DE ELISA DE CAPTURA DE IgM PARA EL DIAGNOSTICO DE DENGUE

Fundamento: se utiliza un anticuerpo anti-IgM humano purificado, que se fija a los pozos de la placa de poliestireno, posteriormente se agregan los sueros problemas, se incuban y se elimina el exceso de reactivos con lavados, las reacciones Ag-Ac (Ac anti-IgM- IgM del suero) que ocurren no son eliminadas por el lavado y quedan fijas en el pozo. Cuando se agrega antígenos de Dengue, ocurre la segunda reacción Ag-Ac entre las IgM.

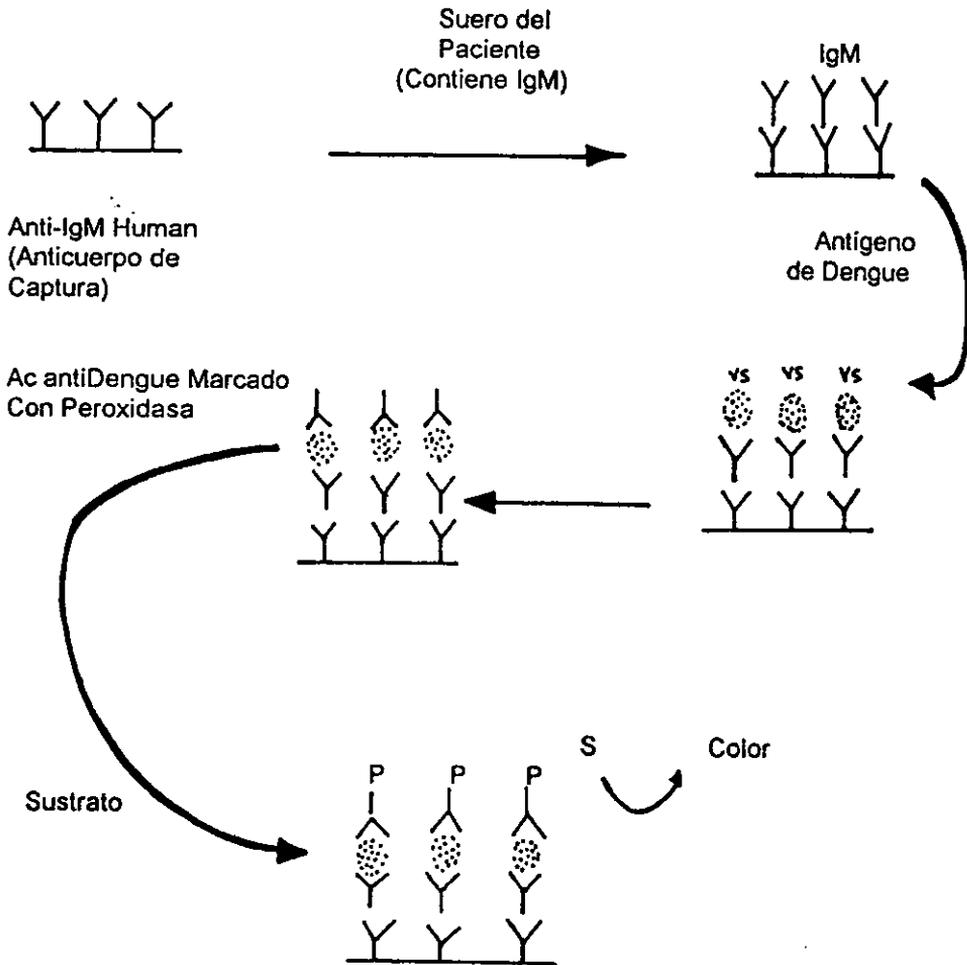


Figura No. 14 Método de ELISA de Captura de IgM para el diagnóstico de Dengue

Primer día:

1.- Preparación de la placa:

- a) Lavar la placa tres veces con agua destilada
- b) Secar con pequeños golpes

2.-Sensibilización:

a) A cada pozo agregar 100 μ L de anti-IgM (dilución 1:50 en buffer de carbonatos: 1.59 g Na_2CO_3 , 2.3 g NaHCO_3 y H_2O destilada 1Lt., la dilución se hace dependiendo de la casa comercial del lote y del título obtenido en un ensayo previo).

Nota: solo se sensibilizan los 60 pozos internos de la placa.

- b) Incubar a 4 °C en cámara húmeda hasta otro día.

Segundo día:

3.- Lavar las placas 5 veces con PBS (8 g NaCl, 0.2g KCl, 0.14 g KH_2PO_4 , 0.91g NaH_2PO_4 ajustar a pH = 7.4)

4.- Bloqueo:

- a) Llenar con 100 μ L los pozos con albúmina al 4 % en PBS
- b) Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

5.- Lavar las placas 5 veces con PBS.

6.- Reacción con suero:

- a) Diluir el suero 1: 40 en PBS que contenga albúmina bovina al 0.5%.
- b) Agregar 50 μ L de cada muestra a los pozos correspondientes.
- c) Incubar por 2 horas a 37 °C en baño María.

7.- Lavar las placas 5 veces con PBS

8.- Reacción con antígeno:

- a) Adicionar 50 μ L de la mezcla de antígeno (Den-1, Den-2, Den-3 y Den-4) a cada pozo.

(Previamente diluido en suero normal humano al 20% ; titulado y ajustado en el INDRE por HA y ELISA)

- b) Incubar a 4 °C toda la noche en cámara húmeda.

Tercer día:

9.- Lavar las placas 5 veces con PBS.

10.- Reacción con conjugado

- a) Agregar 25 μ L de conjugado a cada pozo.

Nota: El conjugado consiste en un anticuerpo monoclonal anti-dengue (flavivirus) marcado con peroxidasa, diluido en suero normal humano/PBS. La dilución del conjugado se hace 1: 2000 - 1: 6000 dependiendo del lote.

- b) Incubar 1 hora a 37 °C en baño María.

11.-Lavar las placas con PBS 7 veces.

12.-Reacción con sustrato.

- a) Agregar 100 μ L de sustrato a cada pozo.

El buffer de sustrato es comercial y consta de citratos con H_2O_2 y el cromógeno es ABTS, se preparar volumen a volumen de cada uno.

- b) Incubar a 37 °C durante 30 minutos en baño María.

c) Continuar la incubación a temperatura ambiente hasta que el control positivo este por arriba de una densidad óptica de 1.0. Cerciorarse del color.

13.- Leer las placas a 405 - 410 nm. El suero control negativo es ajustado como blanco.

14.- Interpretación: cada placa debe contener dos sueros controles positivos y un control negativo. Un control positivo alto y un control positivo bajo, si los resultados de estos dos controles no están en un valor apropiado la prueba no es valida.

Los sueros problema con una densidad óptica mayor a 0.1 son considerados como positivos.

15.- Los reactivos a utilizar para la técnica de ELISA deben ser conservados a -20 °C excepto el sustrato y albúmina.

5.5 DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

Fundamento: es un ensayo de unión de colorante, en el cual un cambio diferencial de color ocurre en respuesta a varias concentraciones de proteína.

La absorbancia máxima para una solución ácida de azul brillante de Coomassie es de 465 a 595 nm cuando se une a proteínas. El colorante azul de Coomassie se une a residuos de aminoácidos principalmente básicos y aromáticos, especialmente arginina. La ley de Beer puede ser aplicada para una cuantificación segura de proteína seleccionando una apropiada relación de volumen de colorante a la concentración de la muestra.

La prueba empleada para la determinación de proteínas es el microensayo diseñado por BIO-RAD (Modificado de Bradford, 1976). Los sistemas fueron preparados como se describe a continuación:

Tubo	Agua destilada (μL)	μL de albúmina (1 mg/ml)	Reactivo de Bradford (μL)
1	800	0	200
2	795	5	200
3	790	10	200
4	785	15	200
5	780	20	200

El reactivo de Bradford es adicionado al final, y todos los tubos son mezclados en vórtex y se dejan reposar durante 20 minutos antes de ser leídos en un espectrofotómetro Beckman DU-62 a 595 nm.

La absorbancia dada por las muestras es interpolada a una gráfica que se construye con los datos de los tubos 1,2,3,4 y 5, se calibra el aparato con la solución del tubo blanco.

La curva se alinea en el eje de las abscisas la cantidad en mg/ml de proteína (albúmina en la determinación de proteínas en el Ag) y la absorbancia dada por cada una de las soluciones en el eje de las ordenadas. Se realiza la regresión lineal de dichos puntos, y se interpola en la curva el valor de la absorbancia dado por las muestras en cuestión; obteniéndose así la concentración de proteína.

5.6 HEMAGLUTINACION PASIVA EN CAPILAR

Fundamento: a los eritrocitos frescos se les puede acoplar moléculas pequeñas ó macromoléculas. En el caso de sustancias de peso molecular bajo, se utilizan métodos químicos apropiados para establecer enlaces covalentes que unan tales moléculas con los grupos químicos de la membrana del eritrocito ó con tratamiento previo del eritrocito con ácido tánico.

Los eritrocitos al ser recubiertos con antígeno se les llama eritrocitos sensibilizados.

1.-Activar los glóbulos rojos de carnero con ácido tánico.

La solución de ácido tánico se prepara: con 0.1 g de ácido tánico en 10 ml de solución salina. Se conserva en frasco ámbar a 4 °C por no más de un mes.

La solución de trabajo se prepara al momento de usarse, haciendo una dilución 1:200 en PBS (dilución final 1:20,000).

Los eritrocitos de carnero se conservan en solución de Alsever's y deben de usarse una semana después de haberse obtenido.

Antes de usar los eritrocitos de carnero filtrar con gasa estéril, se lavan tres veces con PBS pH = 7.2 y se ajustan a una concentración final del 4 % en PBS. Se coloca en un tubo de polietileno de 50 ml, 2 ml de eritrocitos de carnero al 4 % y 2 ml de la solución de ácido tánico diluida a 1:20,000.

2.-Se mezcla por inversión y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos.

3.-Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos.

4.-Descartar el sobrenadante y agregar 10 ml de PBS. Se repite 3 veces el procedimiento.

5.-Al sedimento del último lavado se agregan 16 ml de PBS para obtener así una suspensión al 0.5% de eritrocitos tratados con ácido tánico.

6.-Realizar una suspensión de glóbulos rojos de carnero tanizados con el antígeno a una concentración de 1.0 mg/ml.

7.-En un papel parafilm se coloca 14 μ L de la suspensión (glóbulos rojos de carnero tanizados y antígeno a una concentración 1.0 mg/ml) y 7 μ L de suero problema, por capilaridad se colocan en un tubo capilar para microhematocrito sin heparina, se sella con plastilina, se agita el tubo capilar sobre una superficie plana.

8.- Esperar 30 minutos para observar la aglutinación.

9.- Interpretación de la prueba: si hay aglutinación es el suero es positivo.
Si no la hay el suero es negativo.

5.7 TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Fundamento: Consiste en el uso de anticuerpos específicos conjugados a moléculas fluorescentes, que al ser excitadas con luz ultravioleta de una cierta longitud de onda, emiten luz visible de un color característico.

5.7.1 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La inmunofluorescencia directa se basa en el principio de poner sobre una superficie el antígeno viral, el cual se va a unir un anticuerpo monoclonal para dengue marcado con fluoresceína, para obtener el complejo antígeno - anticuerpo.

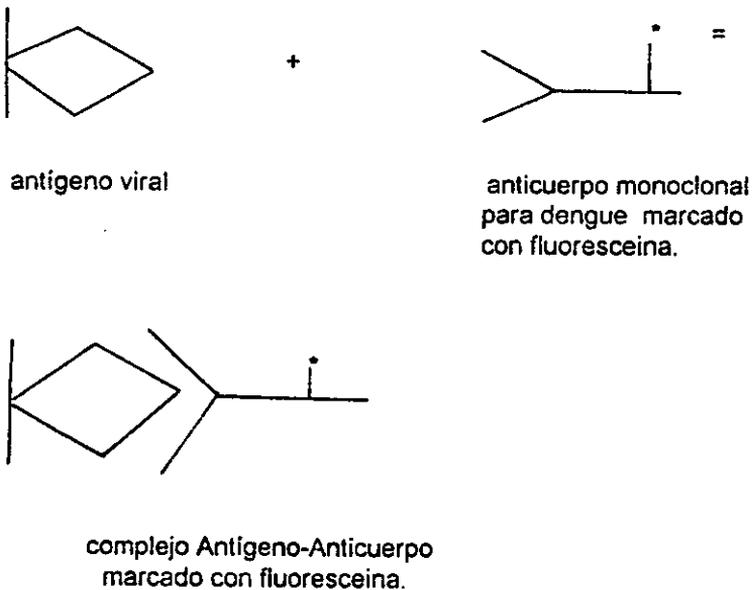


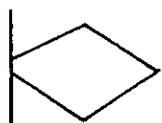
Figura No.15 Inmunofluorescencia Directa

Procedimiento:

- a) Colocar la solución de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con el antígeno de dengue en la laminilla cubierta con teflón para inmunofluorescencia .
- b) Dejar secar la muestra en campana de flujo laminar.
- c) Fijar inmediatamente con acetona fría durante 15 minutos y secar con aire.
- d) Agregar 12 μ L de conjugado (anticuerpo monoclonal para dengue diluido 1:300 en PBS pH=7.5 (Figura No. 15)
- e) Incubar las laminillas en una cámara húmeda a 37 °C por 30 min.
- f) Enjuagar la laminilla con solución salina amortiguadora de fosfatos (pH = 7.5). por 10 minutos agitando.
- g) Absorber el exceso en papel (pero nunca secar completamente).
- h) Depositar 2 gotas de medio de glicerina (90 % de glicerina y 10 % de sol. salina de fosfatos) y montar cubreobjeto.
- i) Observar las laminillas (FA) con microscopio de fluorescencia.
- j) Las laminillas deben guardarse en una caja oscura para evitar que les de la luz

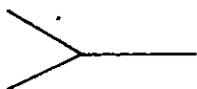
5.7.2 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFA)

La muestra, a la que se le realizó inmunofluorescencia directa y resultado positiva, se utiliza para serotipificar el virus presente.



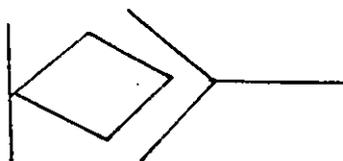
antígeno viral

+



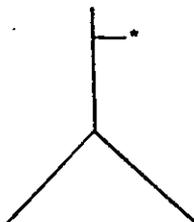
=

anticuerpo monoclonal
especifico para cada serotipo.

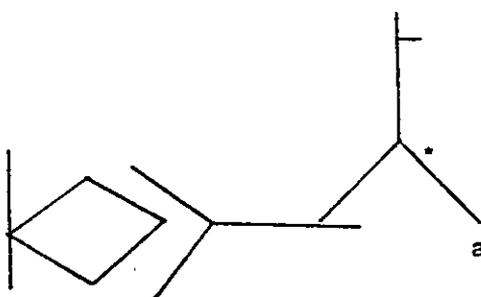


complejo Antígeno-Anticuerpo

+



anti-ratón marcado con
fluoresceina



complejo-Antígeno-Anticuerpo
anti-ratón marcado con
fluoresceina

Figura No. 16 Inmunofluorescencia Indirecta

Procedimiento:

- a) Colocar la muestra en la laminilla para inmunofluorescencia.
- b) Dejar secar en la campana de flujo laminar aproximadamente durante 30 minutos.
- c) Se coloca la laminilla en acetona fría para fijar durante 15 minutos, se sacan de la acetona.
- d) Colocar la laminilla en una cámara húmeda y se les agrega 12 μ L de anticuerpos monoclonales (diluidos 1:10 con PBS pH = 7.5) específicos para cada serotipo. (Figura No. 16)
- e) Incubar las laminillas a temperatura de 37 °C por 30 minutos en una cámara húmeda.
- f) Enjuagar las laminillas en solución salina amortiguadora de fosfatos por 10 minutos.
- g) Absorber el exceso en papel
- h) Agregar 12 μ L de conjugado (anti-ratón marcado con fluoresceína diluido 1:100 con PBS pH = 7.5) incubar las laminillas por 30 min. a una temperatura de 37 °C en una cámara húmeda.
- i) Enjuagar con solución salina amortiguadora de fosfatos.
- j) Colocar 2 gotas de medio de glicerina (90% glicerina y 10 % PBS) a cada laminilla y montar cubreobjetos.
- k) Observar con microscopio de fluorescencia.

5.8 CITOMETRIA DE FLUJO LAMINAR

Fundamento: permite la caracterización morfológica de células en suspensión, y con el uso de anticuerpos monoclonales acoplados a diferentes fluorocromos se puede identificar poblaciones celulares por sus moléculas de membrana CD (antígenos de diferenciación de grupo, del inglés "Cluster of differentiation"); en la actualidad se conocen más de 170 marcadores CD y para muchos de ellos se cuenta con anticuerpos monoclonales que los reconocen.

La citometría de flujo laminar se basa en el paso de un flujo de células individuales en suspensión por la celda de detección, en donde la luz de un rayo laser es dispersada ligeramente hacia adelante (esta dispersión de la granularidad de las mismas) y adicionalmente se emite fluorescencia si un anticuerpo conjugado a un fluorocromo se encuentra sobre esa misma célula. Las distintas señales luminicas son enviadas a diferentes detectores del citómetro de flujo, en donde son transformadas primero a pulsos eléctricos y después a señales digitales que son manejadas gráficamente en una computadora.

Procedimiento:

- 1) Suspensión de glóbulos rojos tratados con ácido tánico (dilución 1:20,000)
- 2) Antígeno de Dengue con una dilución 1:100
- 3) En un tubo de plástico para Citómetro de Flujo se coloca el antígeno de Dengue y los glóbulos rojos tratados con ácido tánico.
- 4) Incubar 2 horas a 4°C
- 5) Agregar el monoclonal Dengue-3 diluido 1:1000
- 6) Incubar 2 horas a 4 °C
- 7) Lavar con PBS a pH=7.2
- 8) Agregar un anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína
- 9) Incubar 2 horas a 4°C
- 10) Lavar con PBS a pH= 7.2
- 11) Tener un volumen final de 400 µL con PBS. Leer al Citómetro de Flujo en el canal con la longitud de onda para la fluoresceína (488 nm)

6. RESULTADOS

Se estableció la concentración del antígeno y la dilución de los glóbulos rojos de ganso con lo que se logra una aglutinación de los glóbulos rojos sin importar el pH del amortiguador.

La concentración seleccionada de antígeno fue 1:640 y glóbulos rojos de ganso 1:200 (0.5%), es necesario establecer un pH para favorecer la reacción
Tabla No.5

Se trabajaron con concentraciones cercanas a las obtenidas en el tabla No.5 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6% de glóbulos rojos unos fijados con glutaraldehído al 1% y otros no; también con dos diluciones de antígeno (Den-2) 1:640. Se consideró una variable más glóbulos rojos de ganso lavados y sin lavar.

Los resultados se hicieron por duplicado en diferente día. Se observó que en una concentración de glóbulos rojos al 0.6% y al 0.5% se alcanzó a observar un buen fenómeno de aglutinación en capilar. Como tesigo negativo se utilizaron glóbulos rojos al 0.5% fijados y no fijados sin antígeno, en ellos no se observó aglutinación.

En la segunda fase se elaboró un sistema con una concentración de glóbulos rojos de ganso al 0.5% fijados con glutaraldehído y con antígeno.

Se fijaron en placas de teflón para inmunofluorescencia con acetona fría. Se agregó un monoclonal antinflavivirus fluoresceinado y se incubó 30 minutos a 37 °C. **Figura No.17** Después se enjuagó con PBS y se observó al microscopio de fluorescencia, así como en Citometría de Flujo con la variante que la reacción se realiza en tubo y en fase líquida.

Los glóbulos rojos con glutaraldehído presentaron alta autofluorescencia en microscopía aún en el sistema que no tenía antígeno. En el Citómetro de Flujo se presentó una considerable diferencia entre los glóbulos rojos con glutaraldehído y sin él, aunque no tuvieran antígeno. **Gráfica A** Por lo que se descarta el uso del glutaraldehído en los experimentos subsecuentes.

Los glóbulos rojos de ganso se deterioraron muy rápido y se decidió probar con glóbulos rojos de carnero en el sistema anterior. Con esto se consiguieron mejores resultados en Citometría de Flujo y en Inmunofluorescencia. Utilizando ácido tánico 1: 20,000 como reactivo ya que expone grupos químicos en el glóbulo rojo, favoreciendo la unión de denguevirus a su superficie. **Gráfica B**

Una vez que los antígenos se adhieren a los glóbulos rojos de carnero se procedió a analizar si un suero de ratón contra un antígeno conocido (Den-3) era capaz de reconocer específicamente al antígeno homólogo. Se realizó una dilución 1:1000. Obteniéndose que el suero de ratón anti-dengue 3 reconoció a los cuatro antígenos sobre los eritrocitos en forma cruzada. **Gráfica C y D**

Se llevo a cabo la titulación de los diferentes serotipos de Dengue por la técnica de Hemaglutinación para realizar la mezcla de los antígenos empleados en la técnica de ELISA. Así como saber cuál es el pH óptimo donde se encuentra el mayor número de unidades hemaglutinantes. **Tabla No. 6**

Se cuantificaron proteínas de los antígenos por el método de Bradford para conocer la concentración de cada uno de los serotipos de Dengue. **Tabla No. 7**

Estos se utilizaron para preparar la suspensión de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con el antígeno a una concentración final de proteínas 1.0 mg/ml. Posteriormente se probaron diferentes proporciones del reactivo y el suero del paciente para determinar cual es la mejor relación entre los dos. **Tabla No. 8**

Se realizó la técnica de hemaglutinación pasiva en capilar, colocando dos partes del reactivo y una parte de suero del paciente con título positivo y negativo para IgM de Dengue. **Figura No. 18**

Posteriormente se observó la hemaglutinación pasiva en capilar de un suero positivo en el microscopio invertido. **Figura No. 19**

Se seleccionaron 250 sueros positivos y 50 sueros negativos de pacientes previamente analizados por la prueba de ELISA. Estos mismos sueros se emplearon para la prueba de Hemaglutinación Pasiva en Capilar obteniéndose un 100 % de concordancia. **Tabla No. 9**

La determinación de la especificidad de la prueba de Hemaglutinación Pasiva en Capilar se llevo a cabo utilizando sueros positivos a Citomegalovirus, Cisticercosis, Epstein Baar, Herpes, Hepatitis B, Rubéola, Sarampión, Tuberculosis y Varicela. Obteniéndose reacción cruzada con un suero de Herpes posiblemente debido a un falso positivo ya que el suero se encontraba demasiado ictérico. **Tabla No. 10**

Se realiza la prueba de estabilidad de los glóbulos rojos de carnero sensibilizados con ácido tánico a diferentes temperaturas 4, 8 25 y 36 °C. Probandose con la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar a diferentes horas **Tabla No.11**

Tabla No.5 PRIMERA FASE: SELECCION DE LA CONCENTRACION ADECUADA PARA UTILIZAR LOS GLÓBULOS ROJOS DE GANSO

Sistema con un lavado

Glóbulos rojos de ganso al 0.3 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.4 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+)
Glóbulos rojos de ganso al 0.5 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+++)
Glóbulos rojos de ganso al 0.6 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(++)
Glóbulos rojos de ganso al 0.3 % sin fijar con antígeno 1:640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.4 % sin fijar con antígeno 1:640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.5 % sin fijar con antígeno 1:640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.6 % sin fijar con antígeno 1:640	(++)

Sistema sin lavado

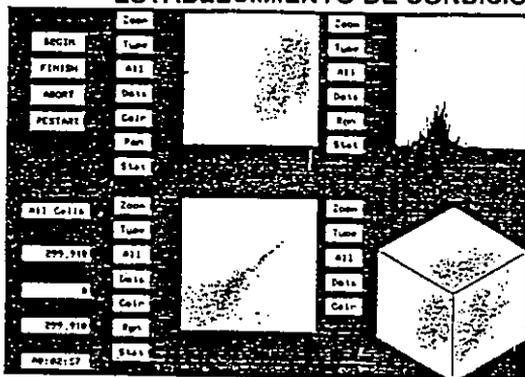
Glóbulos rojos de ganso al 0.3% fijados con glutaraldehído al 1%	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.4% fijados con glutaraldehído al 1 %	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.5 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+)
Glóbulos rojos de ganso al 0.6 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+)
Glóbulos rojos de ganso al 0.3 % sin fijar con antígeno 1: 640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.4 % sin fijar con antígeno 1: 640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.5 % sin fijar con antígeno 1: 640	(-)
Glóbulos rojos de ganso al 0.6 % sin fijar con antígeno 1: 640	(-)

SELECCION DE LA CONCENTRACION ADECUADA PARA UTILIZAR LOS GLÓBULOS ROJOS DE GANSO

Sistema con un lavado

Glóbulos rojos de carnero al 0.3 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(-)
Glóbulos rojos de carnero al 0.4 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+)
Glóbulos rojos de carnero al 0.5 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(++++)
Glóbulos rojos de carnero al 0.6 % fijados con glutaraldehído al 1 %	(+++)
Glóbulos rojos de carnero al 0.3 % sin fijar con antígeno 1:640	(-)
Glóbulos rojos de carnero al 0.4 % sin fijar con antígeno 1:640	(-)
Glóbulos rojos de carnero al 0.5 % sin fijar con antígeno 1:640	(+)
Glóbulos rojos de carnero al 0.6 % sin fijar con antígeno 1:640	(++)

ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES EN EL CITOMETRO DE FLUJO



Run Protocol

SAMPLE INFO

ID: DEMO

File: [NO] REAGENT LIST SAVE SET

COUNT

Count: 20,000

Gate: [R1]

ACQ/PL1

Mode: All Cells

Region: [R1]

TIME

LIST-MODE STORAGE

File: [R1]/[R1]/DEMO2201

Gate: [R1] Name: [AUTO-SAVE] Direct Disk Storage

INPUT & OUTPUT PARAMETERS

Dimension	Input	Output	Parameter	Description
P1	[R1]	[R1]	FSC-H	FSC-no gate
P2	[R1]	[R1]	SSC-H	FSC-no gate
P3	[R1]	[R1]	FL1-H	FL1-no gate
P4	[R1]	[R1]	FL2-H	FL2-no gate
P5	[R1]	[R1]	FL3-H	FL3-no gate

FACTORY DETECTORS

Consumption

Transmit

750 100 300 500 600 700 800 900 999

999 100 300 500 600 700 800 900 999

FACTORY PARAMETERS

P1 P2 P3 P4

FSC-H SSC-H FL1-H FL2-H FL3-H

LOG LOG LOG LOG

2.00 1.00 1.00 1.00

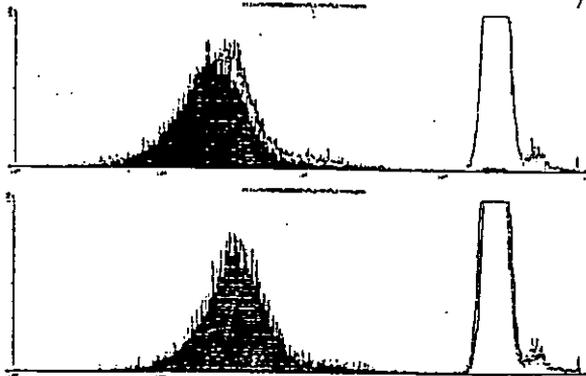
FACTORY COMPENSATION

FL1 FL2 FL3

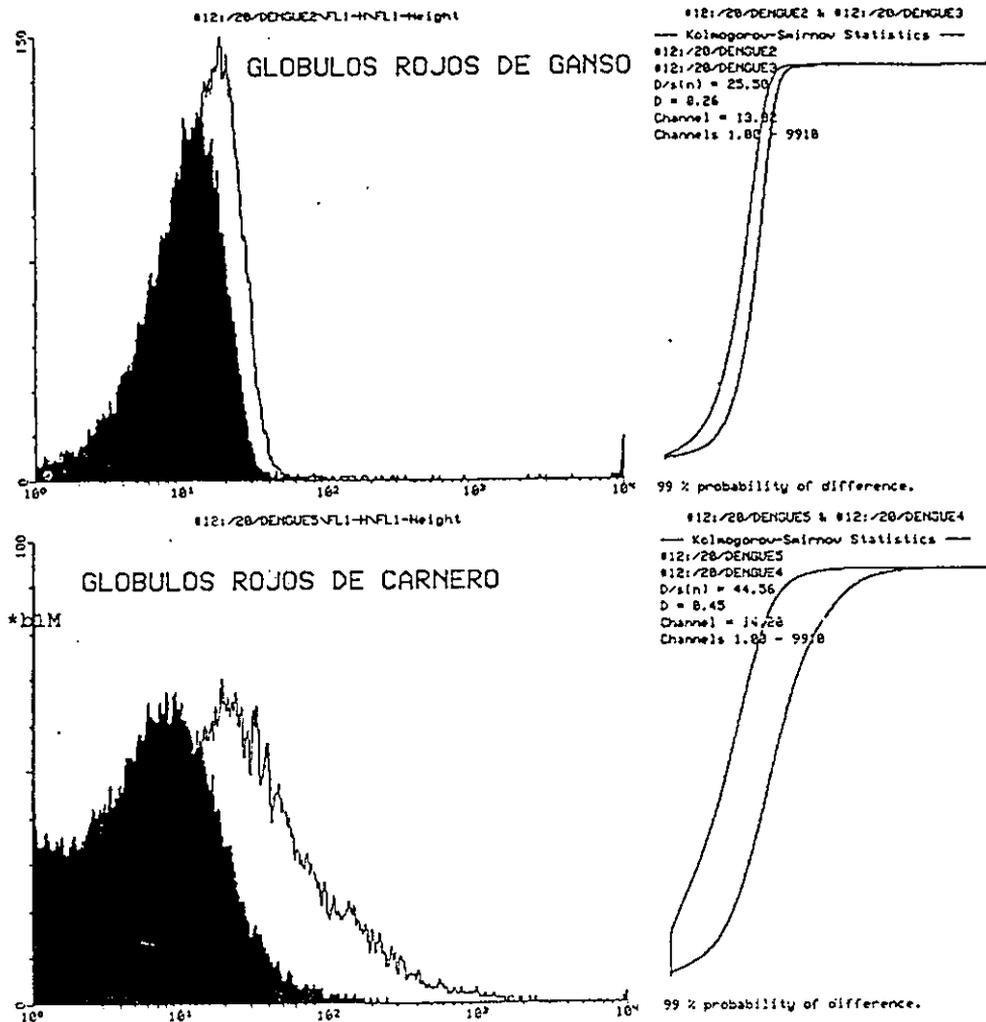
0.0 x 0.0 x 0.0

100 0 100 0 100 0

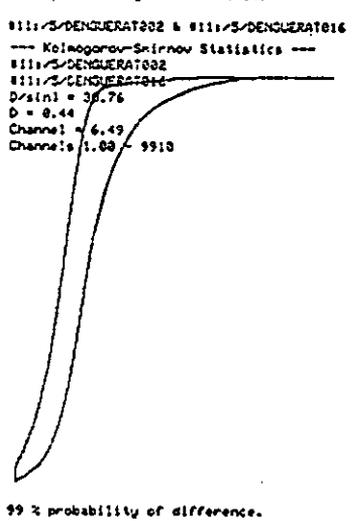
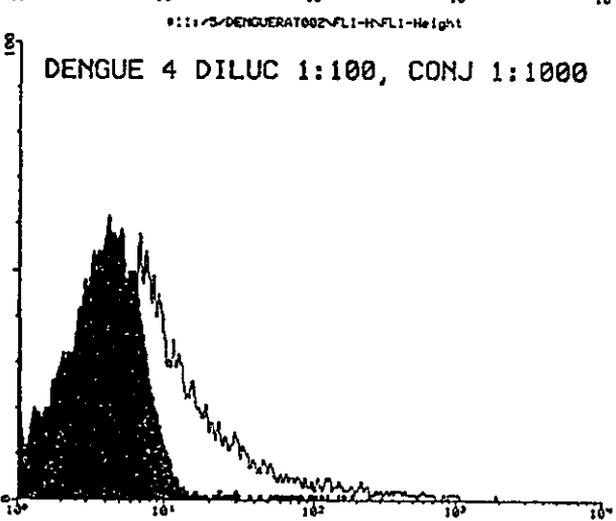
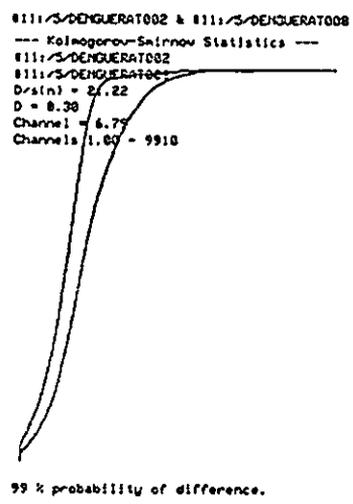
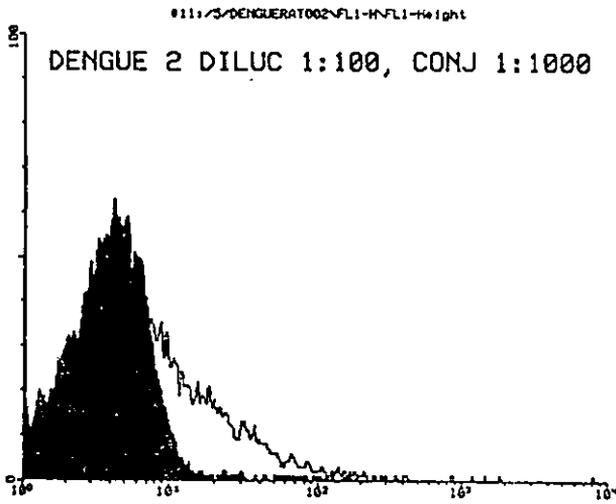
Gráfica A



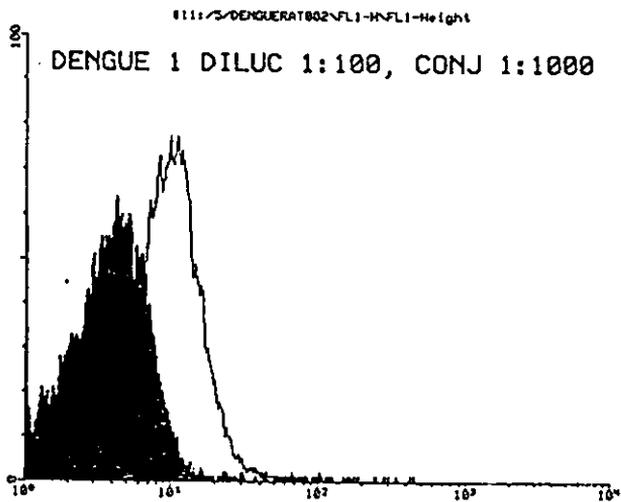
Se presentó una considerable diferencia entre los glóbulos rojos con glutaraldehído y sin él, aunque no tuvieran antígeno



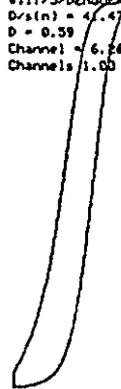
Gráfica B representa la diferencia de fluorescencia que existe al emplear glóbulos rojos de ganso y glóbulos rojos de carnero. El histograma negro representa glóbulos rojos sin antígeno y el histograma blanco representa glóbulos rojos cubiertos con antígeno.



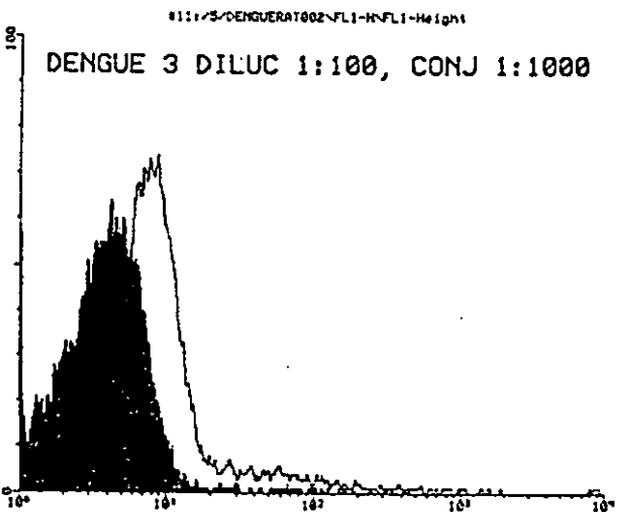
Gráfica C : representa el reconocimiento del suero de ratón antidengue-3 contra los glóbulos sensibilizados con los serotipos virales 2 y 4 de Dengue.



#111/S/DENQUERAT002 & #111/S/DENQUERAT004
 --- Kolmogorov-Smirnov Statistics ---
 #111/S/DENQUERAT002
 #111/S/DENQUERAT004
 D*(n) = 4.47
 D = 0.59
 Channel = 6.26
 Channels 1.00 - 9910



99 % probability of difference.



#111/S/DENQUERAT002 & #111/S/DENQUERAT012
 --- Kolmogorov-Smirnov Statistics ---
 #111/S/DENQUERAT002
 #111/S/DENQUERAT012
 D*(n) = 34.05
 D = 8.48
 Channel = 3.42
 Channels 1.00 - 9910



99 % probability of difference.

Gráfica D : representa el reconocimiento del suero de ratón antidengue-3 contra los glóbulos sensibilizados con los serotipos virales 1 y 3 de Dengue.

TABLA NO.6 TITULACION DEL ANTIGENO POR HEMAGLUTINACION

Diluciones del Antígeno

Ag	pH	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
Den-1	6.0	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	6.2	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O
	6.4	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O
	6.6	+	+/-	+/-	+/-	+/-	O	O	O	O	O
	6.8	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Den-2	6.0	+	+	+	O	O	O	O	O	O	O
	6.2	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	6.4	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	6.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.8	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Den-3	6.0	+	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	6.2	+	+	+	O	O	O	O	O	O	O
	6.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	O
	6.6	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	6.8	+	+	+	+	+/-	O	O	O	O	O
Den-4	6.0	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	6.2	+	+	+	+	+	O	O	O	O	O
	6.4	+	+	+	+	+	+	+	O	O	O
	6.6	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O
	6.8	+	+	+	+	+	+	O	O	O	O

+= Hemaglutinación Total

+/- = Hemaglutinación Parcial

O = Formación de Botón

CUANTIFICACION PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

Tubo	Agua destilada (μL)	μL de albúmina (1 mg/ml)	Reactivo de Bradford (μL)	Absorbancia 595 nm
1	800	0	200	0.477
2	795	5	200	0.852
3	790	10	200	1.092
4	785	15	200	1.195
5	780	20	200	1.351

Curva standar:

$$a = 0.5752$$

$$b = 0.04182$$

$$r = 0.9697$$

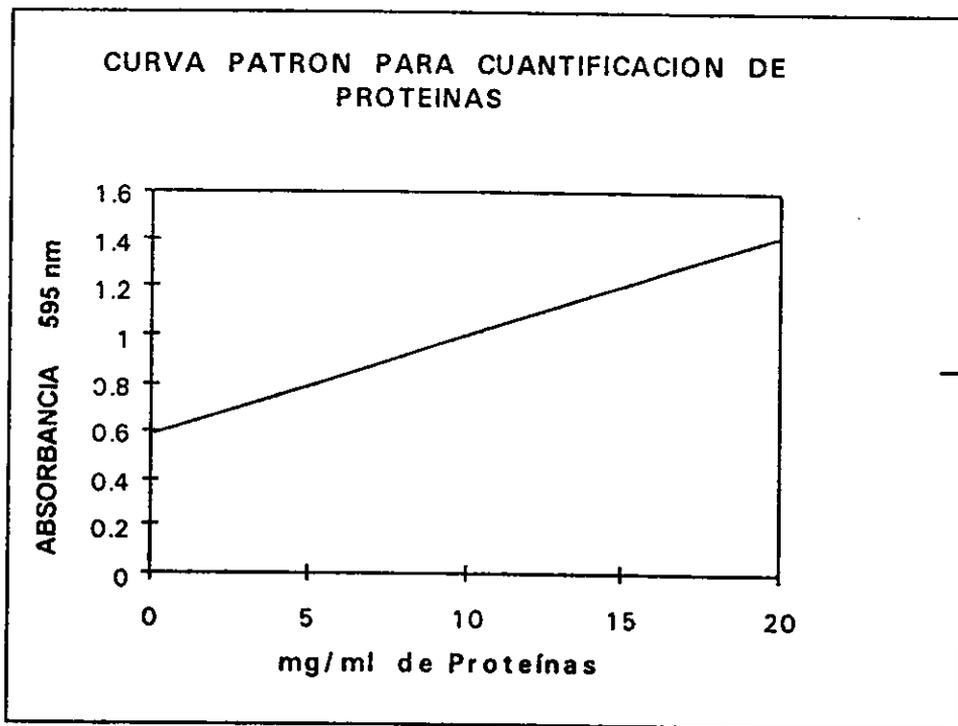


TABLA NO. 7 CUANTIFICACION DE PROTEINAS DE LOS ANTIGENOS DE DENGUE

Serotipo de Dengue	Absorbancia nm	Concentración (mg/ml)
Dengue-1	0.812	2.83
Dengue-2	0.850	3.28
Dengue-3	1.532	11.43
Dengue-4	1.572	11.91

TABLA NO. 8 ESTABLECIMIENTO DE LA RELACION DEL REACTIVO CON EL SUERO DEL PACIENTE PARA OBSERVAR LA HEMAGLUTINACION PASIVA EN CAPILAR

RELACION DEL REACTIVO	HEMAGLUTINACION EN CAPILAR
1:1	+
2:1	+++
3:1	-
4:1	-
1:2	-
1:3	-
1:4	-

+ = Hemaglutinación
 - = No hay hemaglutinación

84

250 sueros positivos	100%	100%
50 sueros negativos	100%	100%

TABLA NO. 10 ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

SUEROS POSITIVOS A	PRUEBA DE HEMAGLUTINACION EN CAPILAR
CITOMEGALOVIRUS	NEGATIVO
CISTICERSOSIS	NEGATIVO
EPSTEIN BARR	NEGATIVO
HEPATITIS B *	POSITIVO
RUBEOLA	NEGATIVO
SARAMPION	NEGATIVO
TUBERCULOSIS	NEGATIVO
VARICELA	NEGATIVO

*Suero ictérico

85

TABLA NO. 11 ESTABILIDAD DE LOS GLOBULOS ROJOS DE CARNERO A DIFERENTES TEMPERATURAS REALIZANDOSE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN PASIVA EN CAPILAR A DIFERENTES HORAS

Temperatura	2 Hrs	4 Hrs	8 Hrs	12 Hrs	24 Hrs	48 Hrs
4 °C	++++	+	++	+	+	+
8 °C	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25 °C	++++	+++	++	-	-	-
36 °C	++++	+++	+	-	-	-

+ = Hemaglutinación

- = No hay hemaglutinación



Figura 17. Inmunofluorescencia vista en un microscopio de luz Ultravioleta para detectar Dengue.

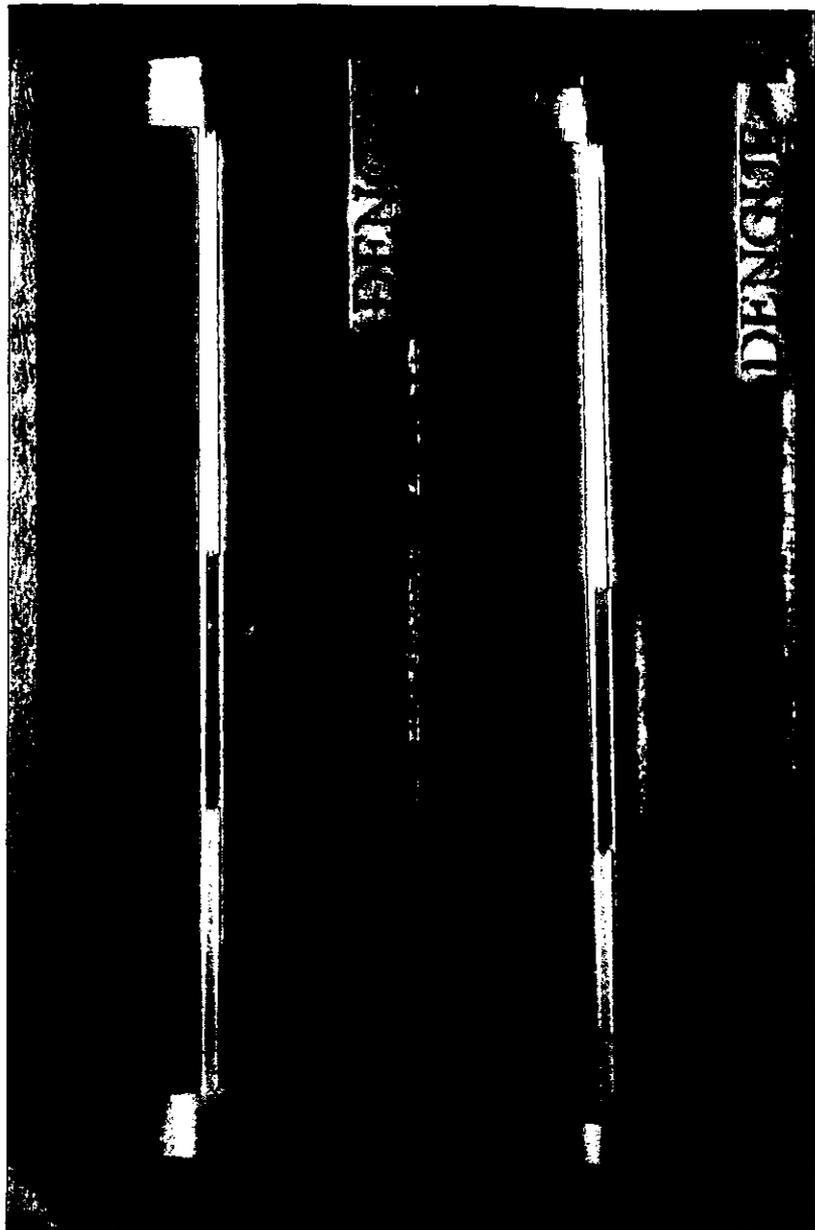


Figura 18. Se realizó la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar. Colocando dos partes de reactivo y una parte de suero del paciente con título positivo y negativo para IgM de Dengue.



Figura 19. Capilar de suero positivo visto en un microscopio invertido, donde se observa la Hemaglutinación Pasiva.

7. DISCUSION

Actualmente en el INDRE, que es el centro donde se hace la referencia en México para la investigación epidemiológica y diagnóstico del Dengue, se dispone de varias técnicas para diagnosticar Dengue como la Inhibición de la Hemaglutinación, ELISA, Aislamiento del Virus por Cultivo Celular, Inmunofluorescencia y PCR. Estas técnicas aunque disponibles son costosas. Desde este punto de vista se pretendió realizar y evaluar una técnica rápida y eficiente para apoyar el diagnóstico del Dengue como sustituto o complemento de la metodología existente hasta ahora.

Cuando existen brotes de Dengue, en las entidades federativas del país envían sus muestras para ser diagnosticadas en el INDRE. El único inconveniente es que son demasiadas las muestras que envía cada estado. En 1997 el estado de Campeche envió 2,611 muestras, Tamaulipas 486, Veracruz 4,161, Colima 2,239, Chiapas 544, Tabasco 5,004. Por lo que se pretende introducir la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar como un tamiz, dado el volumen de muestras que se tiene y dejar las otras técnicas PCR, ELISA y Aislamiento, como confirmatorias. Lo cual servirá para detectar rápidamente si existe Dengue o no y tomar las medidas epidemiológicas necesarias para un mejor control del mosquito. Además, esta se podría hacer en el laboratorio estatal o en el campo utilizando una red fría de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad del reactivo.

La técnica de ELISA de captura de IgM proporciona la ventaja de utilizar una sola muestra para el diagnóstico de Dengue. En la infección primaria por cualquier virus del complejo Dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que las muestras son extraídas después del quinto día de establecimiento de la enfermedad.

En la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar se observó que la concentración del antígeno de Dengue es constante 1 mg/ml de proteínas y en la prueba de ELISA dicho antígeno es inestable, porque cuando se congela y se descongela pierde su concentración.

Para poder llevar a cabo la técnica de ELISA se debe de tener una mezcla de los diferentes serotipos de Dengue con una concentración final de 16 unidades hemaglutinantes (UHA). Se emplea la técnica de Hemaglutinación para conocer las unidades hemaglutinantes de cada antígeno y saber a que dilución se deben preparar. Obtenidos los resultados por la técnica de ELISA se seleccionaron los sueros positivos y negativos para Dengue dando un total de 300 muestras. Y otros sueros que se evaluaron para diferente diagnóstico en el INDRE.

Se realizaron ensayos para sensibilizar los eritrocitos de ganso con glutaraldehído y antígeno de Dengue. Observando que al emplear glóbulos rojos de ganso al 0.5% fijados con glutaraldehído al 1% se observa una mejor aglutinación.

El glutaraldehído se utilizó como solución fijadora y preservadora, sin embargo no nos ayudo en Citometría de Flujo ni en la técnica de Inmunofluorescencia para evaluar la presencia del virus sobre el glóbulo rojo por presentar autofluorescencia.

Los anticuerpos IgM son los que mejores resultados ofrecen en la técnica de Hemaglutinación en Capilar dadas sus características físicas, químicas y biológicas. Por lo anterior, esta técnica nos permitirá detectar casos en sueros únicos así como obtener resultados rápidos.

Con ayuda de la Citometría de Flujo se evaluó el siguiente sistema: glóbulos rojos de ganso al 0.5% fijados con glutaraldehído al 1% con antígeno 1:640 y como control glóbulos rojos de ganso al 0.5% fijados con glutaraldehído al 1% dando como resultados ninguna diferencia entre los glóbulos rojos con glutaraldehído y sin él, aunque no tuviera antígeno. Por lo que se decidió utilizar otro compuesto químico el ácido tánico y descartar el glutaraldehído por presentar un fondo inespecífico.

Los glóbulos rojos de ganso y carnero se recubrieron con antígeno de Dengue uno en cada sistema. Como control se tuvo solamente glóbulos rojos sin antígeno. Al procesar por el Citómetro de Flujo se obtuvo que hubo mayor cantidad de glóbulos rojos de carnero adheridos al antígeno, por lo que representó una mayor diferencia de fluorescencia; en cambio con los glóbulos rojos de ganso es menor la diferencia de fluorescencia. También se realizó la técnica de inmunofluorescencia observándose mejor cuando se utilizan glóbulos rojos de carnero. Esto nos ayuda para descartar los glóbulos rojos de ganso y emplear los glóbulos rojos de carnero en la prueba de Hemaglutinación Pasiva en Capilar.

Los glóbulos rojos sirven como soporte para la absorción de diversos antígenos a su superficie, por lo que son una importante herramienta en inmunología, proporcionando una facilidad en un gran número de técnicas.(70)

A los cuatro antígenos diferentes de Dengue se les cuantifica proteínas por el método de Bradford obteniéndose la concentración en mg/ml. Posteriormente se realiza una suspensión de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con el antígeno a una concentración de 1.0 mg/ml de proteínas. Esta suspensión es útil para llevar a cabo la Técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar. Al cabo de 30 minutos se observa si hay ó no hemaglutinación.

Los 250 sueros positivos y 50 sueros negativos obtenidos por el método de ELISA de Captura de IgM fueron probados en la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar dando como resultado un 100% de confiabilidad tanto en los sueros positivos y negativos.

Para ver la especificidad de la prueba de Hemaglutinación Pasiva en Capilar se utilizaron sueros positivos a Citomegalovirus, Cisticercosis, Epstein Barr, Hepatitis B, Rubéola, Sarampión, Tuberculosis y Varicela. Dando solamente reacción cruzada con el suero de Hepatitis B debido a la ictericia que presenta.

Como la prueba de Hemaglutinación Pasiva en Capilar se pretende utilizar en el campo o en laboratorios donde no se cuenta con lá infraestructura adecuada, se probó la estabilidad del reactivo a diferentes temperaturas y realizando la Hemagutinación en Capilar a diferentes horas, se observó que solamente los glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígeno de Dengue son estables a 8°C durante 15 días presentando una aglutinación adecuada.

Para la prueba de Citometría de Flujo para Dengue se emplearon los glóbulos rojos de carnero por presentar una mayor diferencia de fluorescencia en comparación con los glóbulos rojos de ganso.

Una vez que los antígenos se pegan a los glóbulos rojos de carnero se procedió a analizar si un suero de ratón contra un antígeno conocido Den-3 era capaz de reconocer específicamente al antígeno homólogo. Se realizó una dilución del antígeno 1:100 y del conjugado 1:1000. Obteniéndose que el suero del ratón anti-dengue 3 reconoce a los 4 antígenos sobre los eritrocitos en forma cruzada.

En las gráficas de Kolmogorov-Smirnov nos indica la diferencia de fluorescencia que existe exponencialmente cuando se utiliza glóbulos rojos de carnero sin antígeno y glóbulos rojos de carnero sensibilizados con el antígeno de Dengue.

8. CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica de Hemaglutinación Pasiva en Capilar, utilizando glóbulos rojos de carnero lo cual nos permite obtener buenos resultados en 30 minutos.

Se comparó la sensibilidad y estabilidad del reactivo dando una buena sensibilidad para diagnosticar Dengue. La estabilidad del reactivo solo es buena a 8°C por lo que se recomienda utilizar para su transporte una red fría y poder utilizarse en el campo.

La estandarización de la técnica de Citometría de Flujo nos fue útil para detectar que cantidad de antígeno que se encuentra adherido a la superficie de los glóbulos rojos de carnero y ganso. Separándolos de acuerdo a la intensidad de fluorescencia en comparación con su respectivo control sin antígeno.

Para ser utilizada la Citometría de Flujo en el diagnóstico de Dengue y saber cual serotipo de Dengue es el que tiene el paciente no nos es muy útil debido a que encontramos una reacción cruzada al utilizar los diferentes serotipos del virus dengue con un suero de ratón anti-dengue 3 por lo que se descarta su uso. Tal vez si se usaran anticuerpos monoclonales, si se podría hacer esta diferenciación, pero aumentaría el costo de la misma prueba que en sí misma resulta muy cara por el mantenimiento del aparato y reactivos.

9. APENDICE

Preparación de soluciones:

Albúmina bovina al 4% (fracción V) BABS
Albúmina bovina ----- 4.0 g
Borato salino pH = 9 ----- 100 ml
Esterilizar por filtración

Solución de Alservers

Dextrosa ----- 20.5 g
Cloruro de sodio ----- 4.2 g
Acido cítrico ----- 0.55 g
Citrate de sodio ----- 8.0 g
Agua destilada aforar a ----- 1000 ml
Esterilizar en autoclave a 10 lbs de presión durante 10 min.

Acido Bórico 0.5 M

Acido bórico ----- 30.92 g
Agua destilada caliente ----- 700 ml
Agua destilada c.b.p. ----- 1000 ml

Cloruro de sodio 1.5M

Cloruro de sodio ----- 87.68 g
Agua bidestilada c.b.p. ----- 1000 ml

Borato salino pH = 9

Solución de NaCl 1.5 M ----- 80 ml
Solución de ácido bórico ----- 100 ml
Hidróxido de sodio 1.0 N ----- 24 ml
Agua destilada c.b.p ----- 1000 ml

Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV)

Barbital	-----	0.58 g
Barbiturato sódico	-----	0.38 g
Gelatina	-----	0.60 g
Cloruro de calcio anhidro	-----	0.02 g
Sulfato de magnesio. 7H ₂ O	-----	0.12 g
Cloruro de sodio	-----	8.50 g
Glucosa	-----	10.00 g
Agua destilada c.b.p.	-----	1000ml

Fosfato de sodio dibásico 2 M
(Na₂HPO₄)

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

Fosfato de sodio monobásico 0.2 M en Cloruro
de sodio 0.15 M

Cloruro de sodio 1.5 M	-----	100 ml
Fosfato de sodio monobásico	-----	100 ml
Agua destilada	-----	800 ml

Fosfato de sodio monobásico 2 M

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

Fosfato de sodio dibásico 0.2 M en cloruro
de sodio 0.15 M

Cloruro de sodio 1.5 M	-----	100 ml
Fosfato de sodio dibásico 2 M	-----	100 ml
Agua destilada	-----	80 ml

Soluciones de trabajo a diferentes buffers para la prueba de IHA

pH	Na ₂ HPO ₄ 0.2M en NaCl 0.15 M	NaH ₂ PO ₄ 0.2M en NaCl 0.15 M
6.0	12.5 ml	87.5 ml
6.2	22.0 ml	78.0 ml
6.4	32.0 ml	68.0 ml
6.6	45.0 ml	55.0 ml
6.8	55.0 ml	45.0 ml
7.0	64.0 ml	36.0 ml
7.2	72.0 ml	28.0 ml
7.4	79.0 ml	21.0 ml

El pH se obtiene cuando se mezcla volúmenes iguales del buffer elegido y de borato salino pH= 9

Obtención de sangre de carnero:

Al tener el animal en posición, se realiza una tricotomía en la región lateral del cuello se hace la asepsia del área a puncionar. La dirección de la aguja es contraria al flujo sanguíneo, teniendo cuidado que la sangre fluya constantemente. Al retirar la aguja, el lugar de la punción se cubre con una torunda, embebida en solución antiséptica, haciendo presión. Se reincorpora el borrego a su corral. La sangre recolectada de la jeringa se vierte en un frasco que contiene Alsever's se agita y se mantiene en refrigeración.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1) RUSH 1789. An account of the bilious remitting fever, as it appeared Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. In: Medical inquiries and observations, Philadelphia. Prichard and Hall. pp. 104-121.
- 2) EHRENKRANZ NJ. VENTURA, A.K. CUADRADORR, PONDWL PORTER JE. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States-past, present and potential problems. N. Engl. J. Med. 1971, 285: 1460-1469.
- 3) ROSEN L. Observations on the epidemiology of dengue in Panama. Am. J. Hyg. 1958, 68: 45-58.
- 4) Centers for Disease Control. Dengue type 4 infections in U.S. travelers to the Caribbean. MMWR 1981. 30: 249-250.
- 5) SCHLIESSMAN DJ. CALHEIROS LB. A review of the status of yellow fever and Aedes aegypti eradication programs in the Americas. Mosq. News, 1974. 34: 1-9.
- 6) GUBLER DJ. Dengue in the United States, 1983-1984. MMVR, 1985, 34: 555-560.
- 7) KOURI G., VALDEZ M. et. al. Epidemia de Dengue en Nicaragua, 1985. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1991. 33 (5): 365-371.
- 8) ZARATE AQUINO MA. LUISA, DEL RIO ZOLEZZI AURORA, VALDESPINO GOMEZ JOSE LUIS. El diagnóstico de laboratorio de Dengue en apoyo a la vigilancia epidemiológica. Higiene S.S.A 1994. pp. 153-161.
- 9) RIGAU PEREZ JOSE G., AYUSO LAMADRID AGUSTIN., et. al. Dengue Severity Throughout Seasonal Changes in incidence in Puerto Rico, 1989-1992. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994 5(14): 408-415.
- 10) MURRAY. Microbiología Médica. Musby 1994. pp.628-638.
- 11) WESTAWAY E.G. BRINTON MA. GAIDAMOVICH SY. (1985) Flaviviridae Intervirology 24: 183-192.
- 12) REIHLE TM. Classification, distribution and importance of arboviruses. Trop. Med. Parasit. 1989. 40: 391-395.

- 13) RUSSELL PK, BRANDT WE, DALRYMPLE J. M. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: the togaviruses Schlesinger. New York Academic Press. Inc. 1980. pp. 503-529.
- 14) Zarate Aquino Ma. Luisa, Zolezzi del Río Aurora, Valdespino Gomez J.L. Manual de Diagnóstico de la Red de Laboratorios de Enfermedades Febriles Exantemáticas. INDRE. 1993. No. 21 México.
- 15) HENCHAL A. ERIK and PUTNAK ROBERT J. The Dengue viruses. Clinical Microbiology Reviews, 1990. pp. 376-396.
- 16) FIELDS N. BERNARD, KNIPE M. DAVID. Virology Vol. 1. Reven Press New York 1990. pp. 705, 788-792.
- 17) M.V. NERMUT, A.C.STEVEN. Animal Virus Structure. Elsevier Science Publishers B.V. 1987 Vol. 3 Chapter 11.
- 18) LENDELL A. WHITE. Susceptibility of *Aedes albopictus* C636 Cells to Viral Infection. Journal of Clinical Microbiology. 1987. Vol. 25 No.7: 1221-1224.
- 19) CHARLES M. RICE, EDITHE M. LENCHES, et. al. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution Science, 1985. Vol. 229, pp 726-733.
- 20) BARRY FALGOUT. ROGERH. MILLER and CHING-JUH. LAI. Deletion Analysis of Dengue Virus Type 4 Nonstructural Protein NS2B: Identification of a Domain Required for NS2B-NS3 Protease Activity. Journal of Virology 1993. Vol. 67. No.4: 2034-2042.
- 21) WHITE J. MATLIN J. HLENIUS A. Cell fusion by semliki forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. J. Cell Biol. 1981, 89: 674-679.
- 22) F.X. HEINZ, G. AVER, K. STIANSNY, et. al. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. Archives of Virology 1994. Suppl. 9: 339-348.
- 23) LEWIS MARKOFF. In Vitro Processing of Dengue Virus Structural Proteins: Cleavage of the Pre-Membrane Protein. Journal of Virology. 1989. Vol. 63. No.8: 3345-3352.
- 24) FARSHAD GUIRAKHOO; ANN R. HUNT, et. al. Selection and Partial Characterization of Dengue 2 Virus Mutants that Induce Fusion at Elevated pH. Virology 1993. No. 194: 219-223.

- 25) SCHLESINGER JJ, BRANDRISS MW, WALSH EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J. Gen Virol.* 1967, 68: 853-857.
- 26) C. J. LAI, M. PETHEL, L.R. JAN. et. al. Processing of dengue type 4 and other flavivirus nonstructural proteins. *Archives of Virology* 1994. Suppl. 9: 359-368.
- 27) CHARLES M. RICE, RUEDI AEBERSOLD, et. al. Partial N-Terminal Amino Acid Sequences of three Nonstructural Proteins of two Flaviviruses, *Virology*.1986. Vol. 151, pp. 1-9.
- 28) Epidemiología. Dengue Hemorrágico. Boletín Timestral. Vol. 4. No. 10, 1990.
- 29) MARTINEZ TORRES ERIC, Dengue y Dengue Hemorrágico: Aspectos Clínicos. Hospital Pediático Ó William SolerÓ La Habana 1995.
- 30) VALDESPINO GOMEZ JOSE L., VELASCO CASTREJON OSCAR, ESCOBAR GUTIERREZ ALEJANDRO, IBAÑEZ BERNAL SERGIO, et. al. Enfermedades Tropicales en México. Dengue. Instituto Nacional De Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. S.S.A.1994 pp.85-96.
- 31) MORALES FIGUEIREDO LUIZ T., ABE OWA MIYOCO, et. al. Encuesta serológica sobre el Dengue en Ribeirão Preto, São Paulo Brasil. *Bol. oficina Sanit Panam* 1995. 118 (6): 499-509.
- 32) SHOPE ROBERT. Global Climate Change and Infectious Diseases. *Environmental Health Perspectives.* 1991. 96: 171-174.
- 33) WILLIAM A. HAWEY. The Biology of Aedes Albopictus. *J. Amer. Mosquito Contro. Assoc. Suplemento.* December 1988. Vo. 4 : 4-25.
- 34) KURANE, A.L. ROTHMAN, P.G. LIVINGSTON, et. al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue Shock Syndrome *Archives of Virology.* 1994. Suppl. 9: 50-64.
- 35) El Dengue Hemorrágico en México. Suplemento de 1995. Vol. 37 pp. 111-113. *Salud Pœblica de México.*
- 36) VILLALOBOS DE CHACON IRIS. Situación del Dengue en Venezuela Aragua, 1995.
- 37) G. KUNO, I. GOMEZ and D. J. GUBLER. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of Virological Methods* 1991. Vol. 33: 101-113.

- 38) Laboratory Protocols and Procedures. Dengue BRANCH Division of Vector-Borne Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention 2 Calle Casia. San Juan , Puerto Rico.
- 39) Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas Curso Internacional: Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue. "Instituto Pedro Kouri " Ciudad de la Habana, Cuba.
- 40) CASALS JORDI, BROWN V. LENORA. Hemagglutination with Arthropod - Borne Viruses. 1954. January 22: 429-444.
- 41) CLARKE H.D., CASALS J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. pp. 561-573.
- 42) LABORATORY PROTOCOLS AND PROCEDURES. Dengue Branch Division of Vector-Borne Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention. San Juan, Puerto Rico. 00921. pp. 20-28.
- 43) GOMEZ DANTES HECTOR, MONTESANO CASTELLANOS RAUL, TAPIA CONYER ROBERTO. Dengue y Dengue Hemorrágico: Cuadro Clínico, Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1995. 15 (3): 135-143.
- 44) RANDAL J. SCHOEPP, BARRY J. BEATY AND KENNETH H. ECKELS. Dengue 3 Virus Infection of Aedes Albopictus and Aedes Aegypti: Comparison of Parent and Progeny Candidate Vaccine Viruses. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990. Vol.42 No.1: 89-96.
- 45) GORO KUNO. Los Cultivos Celulares para aislamiento e identificación de Virus. Sección Dengue, División de las enfermedades transmitidas por Artropodos, Centro de Contol de Enfermedades. E. U.
- 46) BARRERA SALDAÑA HUGO A., ORTIZ LOPEZ ROCIO, et. al. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Ciencia y Desarrollo. 1993. pp. 50-60.
- 47) LANCIOTTI S. ROBERT, CALISHER H. CHARLES, GUBLER J. DUANE. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptasa Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology. Mar. 1992. Vol. 30 No.3 pp. 545-551.
- 48) CHANG J. GWONG, TRENT W. DENNIS, VORNDAM A. VANCE, et. al. An Integrated Target Sequence and Signal Amplification Assay, Reverse Transcriptase-PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, to Detect and Characterize Flaviviruses. Journal of Clinical Microbiology. 1994. Vol. 32, No.2: 477-483.

49) K. OLSON, C. BLAIR, R. PADMANABHAN, et. al. Detection of Dengue Virus Type 2 in *Aedes albopictus* by Nucleic Acid Hybridization with Strand-Specific RNA Probes *Journal of Clinical Microbiology*, 1988. Vol. 26. No. 3: 579-581.

50) HIRAM OLIVERA DIAZ, ESCOBAR GUTIERREZ ALEJANDRO, Diagnóstico por Biología Molecular. Manual de Tecnicas de Laboratorio Vol. III .

51) ESCOBAR GUTIERREZ ALEJANDRO, VALDESPINO GOMEZ JOSE L., SEPULVEDA AMOR JAIME, ZARATE AQUINO MA. LUISA. Problemas para lograr una vacuna contra el Dengue. *Vacunas Ciencia y Salud*. S.S. A. 1992. pp395-408.

52) GUBLER DUANE J. Dengue/Dengue Hemorrhagic fever in the Americas: Prospects for the year 2000. Division of Vector borne Infectious Diseases, CDC. Forth Collins. U.S.A. pp. 19-27.

53) GUBLER DUANE. J., TRENT D. W. Emergence of Epidemic Dengue/ Dengue Hemorrhagic Fever as a public Health Problem in the Americas. 1994. Raven Press. New York 2: 383-393.

54) GUZMAN MA. GUADALUPE, TRIANA CARIDAD, et. al. Estimación de las afectaciones económicas causadas como consecuencia de la epidemia de dengue hemorrágico ocurrida en Cuba en 1981. *Rev. Cubana Med. Trop.* 1992. 44 (1): 13-17.

55) VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA INTERNACIONAL. Número Especial Dengue Hemorrágico. Dirección General de Epidemiología. 1990. Vol. 4 No.10.

56) GUBLER DUANE J. Vigilancia activa del Dengue y de la Fiebre Hemorrágica del Dengue. *Biol of Sanit Panam* 107 (1) 1989.

57) GUBLER DUANE J. CLARK G. GARY. Community-Based Integrated Control of *Aedes aegypti*: A Brief overview of current programs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. 50 (6): 50-60.

58) CLARK GARY, SEDA H, GUBLER D.J. Use of the Center for Disease Control, backpack aspirator for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1994. 10: 119-124.

59) CLARK GARY G. El desarrollo de un programa de control de Dengue. Dengue Branch Centers for Disease Control and Prevention San Juan, Puerto Rico.

- 60) GUBLER D.J., CASTA VELEZ A. A program for prevention and control of epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico and the US Virgin Islands. Bull PAHO. 1991. 25: 237-247.
- 61) ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Publicación Científica No. 548. 1994.
- 62) Organización Mundial de la Salud. Asamblea Mundial Sobre Salud, Resolución No. 46.31. Ginebra: WHO, 1993.
- 63) GOMEZ H., HENRY M., Paludismo y Dengue. De la erradicación a las zonas de riesgo. Estrategia para la vigilancia y control del Dengue. Secretaría de Salud. 1994. 43: 55-91.
- 64) MCSHARRY J. JAMES. Uses of flow Cytometry in Virology. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 1994. pp. 576-604.
- 65) Boletín Mensual SIDA/ETS Año 8 Num. 2 Febrero 1994. INDRE.
- 66) SOTO PEREA CAROLINA, DR. ALVARADO ALEMAN FRANCISCO J. La fenotipificación inmunológica (CD3+ , CD4+ y CD8+) por citometría de flujo en el paciente VIH positivo: presentación gráfica simplificada. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1994: 14 (3) 184-190.
- 67) Introduction to flow cytometry. A learning guide. Becton-Dickinson 1990.
- 68) SHAPIRO M.H. Practical flow Cytometry. Liss R. Alan, New York 2a. ed. 1988. pp. 21-86.
- 69) ESCOBAR GUTIERREZ ALEJANDRO. Manual de Practicas de Serologia Diagnóstica en Salud Publica. ISET. 1988. pp. 13-16, 25-28.
- 70) JOU YH. MOZZAFERRO KR, MAYER LG. BANKENT BR: Methods for the attachment of haptens and proteins to erythrocytes. Immunochemical techniques Methods in enzymology. New York: Academic Press, 1985. 92: 257.
- 71) ALVARADO ALEMAN FRANCISCO, RAMIREZ VIDAL ANTONIO, ISIBASI ARMANDO; Serologia comparativa en la fiebre tifoidea en niños. Bol. Med. Hospital Infantil de México, Vol. 44. Núm. 5 1987. Pp 254-259.

GLOSARIO

Adinamia: debilitación de la fuerza física.

Alopecia: deficiencia natural o anormal de cabello.

Artralgia: dolor en las articulaciones

Ascitis: aglomeración de serosidad en la cavidad del peritoneo.

Cianosis: coloración azul violácea de la piel, principalmente acentuada en las extremidades, característica de una hematosi insuficiente. Se observa en las afecciones cardíacas.

Depleción: disminución de la cantidad de líquido, especialmente de la sangre del cuerpo ó de un órgano.

Diapédesis: paso de los elementos figurados de la sangre, especialmente de los leucocitos, a través de las paredes íntegras de los vasos.

Diuresis: exceso de orina.

Disnea: respiración con dificultad.

Endemia: enfermedad, generalmente infecciosa, que reina constantemente en épocas fijas en ciertos países por influencias de una causa local especial; puede convertirse en epidemia.

Epidemia: enfermedad que acomete a una región o pueblo.

Epistaxis: flujo de sangre por la nariz.

Equimosis: extravasación de la sangre en el interior de los tejidos. Coloración de la piel producida por la infiltración de sangre en el tejido celular subcutáneo o por la rotura de los vasos capilares subcutáneos.

Eritema: enrojecimiento en manchas de la piel producido por la congestión de los capilares que desaparece momentáneamente por la presión.

Exantema: erupción rojiza de la piel.

Faringitis: inflamación aguda o crónica de la faringe.

Febrícula: estado febril cuya temperatura oscila entre 37.5 °C y 38°C, de forma continua y tenaz, que se observa unas veces de día y otras por la noche.

Hematuria: sangre en orina.

Lipotimia: pérdida súbita y pasajera del sentido y del movimiento, con palidez del rostro y debilidad en respiración y circulación.

Metrorragia: hemorragia en la mujer, fuera del período menstrual.

Mialgias: dolores musculares.

Odinofagia: deglución dolorosa.

Otitis: inflamación del oído.

Vasculitis: inflamación de uno o de varios vasos.

Volemia: volumen de sangre contenido en el sistema vascular aproximadamente del 7-8 % del peso corporal.

Trombocitopenia: disminución del número de plaquetas en la sangre.

Trombosis: formación de coágulos en los vasos sanguíneos.