



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Determinación de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue en
sueros de pacientes en fase aguda y convaleciente de la enfermedad”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:**

RAQUEL RODRÍGUEZ MEZA

Asesores:

Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO

Dr. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI; ESTADO DE MÉXICO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
1. Introducción	1
1.1 Definición y aspectos clínicos de la enfermedad	1
1.2 El vector	2
1.3 El agente etiológico	3
1.4 Estrategia de replicación del virus	4
1.5 Situación en México	7
2. Antecedentes	8
2.1 Diagnóstico de dengue	8
2.2 La proteína no estructural NS1	11
2.3 Determinación y uso de la proteína NS1 para el diagnóstico de dengue	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6. Estrategia experimental	15

7. Materiales y métodos	16
7.1 Selección de sueros	16
7.2 ELISA para la determinación de antígeno viral (proteína NS1)	16
7.3 ELISA para la determinación de anticuerpos específicos IgM contra el virus del dengue	17
7.4 Inmunofluorescencia directa	18
7.5 Análisis estadístico	18
8. Resultados	19
8.1 Determinación de la proteína NS1 por ELISA	19
8.2 Evaluación de sueros por ELISA para la determinación de anticuerpos IgM contra el virus del dengue	21
8.3 Correlación de la expresión de la proteína NS1 del virus del dengue y la producción de anticuerpos IgM específicos en suero	33
8.4 Inmunofluorescencia directa para identificación de la proteína E viral en células C6/36 inoculadas con sueros de casos positivos a NS1	37
9. Discusión	38
10. Conclusiones	45
11. Referencias	46

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Ac	Anticuerpos
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
CO	Punto de corte (<i>del inglés Cut-Off</i>)
D	Resultado dudoso
DC	Dengue clásico
DH	Dengue hemorrágico
DO	Densidad óptica
DEN	Dengue
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático (<i>del inglés: Enzime Linked Immunosorbent assay</i>)
FC	Factor de calibración
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFA	Ensayo de Inmunofluorescencia
LESP-Ver	Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz
MOI	Multiplicidad de infección (<i>del inglés Multiplicity of infection</i>)
NS	Proteína no estructural
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
ROC	Curva estadística <i>Receiver Operator Characteristic</i>
SCD	Síndrome de choque por dengue

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Aedes aegypti</i> .	2
Figura 2. Distribución geográfica del virus del dengue en el año 2009.	3
Figura 3. Estructura del virus del dengue.	4
Figura 4. Ciclo replicativo del virus del dengue.	6
Figura 5. Riesgo de transmisión de dengue en la República Mexicana.	7
Figura 6. Algoritmo vigente en el año 2009 para el diagnóstico de laboratorio de FD y FHD.	10
Tabla 1. Interpretación de las DO obtenidas en la determinación de NS1 y anticuerpos específicos IgM.	25
Tabla 2. Análisis porcentual de la expresión de la proteína NS1 y de anticuerpos IgM en los sueros analizados respecto al inicio de los síntomas de infección por dengue.	34
Figura 7. Gráfica porcentual de la expresión de la proteína NS1 y la producción de anticuerpos IgM específicos respecto a los días de evolución del dengue.	34
Tabla 3. Sensibilidad obtenida para el equipo Platelia con respecto al transcurso del dengue.	35
Tabla 4. Evaluación estadística del equipo Platelia.	35

Figura 8. Curva NS1-ROC.

36

Figura 9. Células C6/36 inoculadas con sueros de fase aguda de dengue y marcadas con AcMo anti-proteína E-FITC.

37

RESUMEN

El Virus del dengue (DEN) es el agente causal de un espectro de entidades clínicas que incluyen el dengue clásico y el dengue hemorrágico. Esta enfermedad es causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus (DEN-1, -2, -3 y -4), los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes. El ser humano es reservorio y hospedero definitivo del DEN y le es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. La multiplicación, distribución, intensidad y tiempo de la transmisión de la enfermedad por dengue son favorecidas por la urbanización creciente, el saneamiento deficiente, el inadecuado almacenamiento de agua, el movimiento de viajeros de áreas endémicas y por las variaciones climatológicas.

La importancia del diagnóstico eficaz de casos de dengue tiene la finalidad de dar un seguimiento epidemiológico adecuado y oportuno. En la actualidad, el algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de dengue contempla al ensayo inmunoenzimático (ELISA) como la técnica de elección para la identificación de la glicoproteína viral NS1 en los casos de fase aguda (día 1 al 5 del inicio de la sintomatología), así como para la detección de anticuerpos específicos IgM y/o IgG en la fase convaleciente de la enfermedad (día 6 en adelante).

El equipo comercial Platelia (Bio-Rad) es el principal dispositivo para el diagnóstico de dengue en la fase aguda. Con la finalidad de conocer el límite de detección del equipo con respecto al curso de la infección, se analizaron 220 muestras de suero de población mexicana procedentes del Estado de Veracruz positivas a la infección. La sensibilidad del equipo para determinar NS1 entre los días 1 al 5 (fase aguda) fue del 94%, en tanto que para los días 6 al 9 (fase convaleciente) fue de 70%. Entre los días 10 al 13 la sensibilidad fue de 52.5%, declinando a 11.1% entre los días 14 al 16, último día en que se detectó la proteína NS1 en los sueros analizados. Simultáneamente, se evaluó la presencia de anticuerpos específicos IgM, obteniendo un 100% de detección a partir del día 6 de haber iniciado los síntomas. Los resultados permiten establecer el límite de detección del equipo hasta el día 9 después de iniciado el cuadro febril; se estableció además, la correlación entre la aparición de IgM y la disminución de NS1 y que el almacenamiento de las muestras por tiempos prolongados a 4° C no tiene efecto significativo sobre la determinación de NS1 pero sí sobre el aislamiento de viriones infectivos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y aspectos clínicos de la enfermedad

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, -2, -3 y -4), los cuales exhiben características antigénicas y serológicas diferentes y presentan variantes genéticas dentro de un mismo serotipo relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa (Monath y Heiz, 1996; Rico, 1990).

Independientemente del serotipo viral que produzca la infección, ésta puede presentarse en cuatro formas clínicas diferentes: (1) la infección subclínica, donde la evidencia sólo es serológica; (2) la forma clínica denominada dengue clásico (DC) o fiebre por dengue (FD) que tiene una duración de 3 a 7 días, en la que predominan los dolores agudos de cabeza, articulaciones, músculos y huesos, junto con fiebre que se eleva en forma brusca precedida de escalofrío y malestar general, siendo también comunes las náuseas, vómito y dolor retro ocular; (3) el dengue hemorrágico (DH) o fiebre hemorrágica por dengue (FHD), el cual se presenta cuando algunos casos de FD se agravan, puede presentarse como DC con manifestaciones hemorrágicas, el cual inicia con un exantema leve que aparece de 3 a 4 días después de iniciado el cuadro febril y en la mayoría de los casos se presenta fragilidad capilar en piel o mucosas (petequias, equimosis o hematomas) e incluso hemorragias menores sin hemoconcentración o plaquetopenia; (4) la última forma clínica incluye a los casos graves que se caracterizan por un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular con efusión pleural o de líquido de ascitis y alteraciones hemostáticas que se manifiestan por infiltración de plasma, hemoconcentración, tendencia al sangrado y trombocitopenia, lo que pueden llevar a l síndrome de choque por dengue (SCD) (Rothman y Ennis, 1999). La severidad de la enfermedad esta asociada a la edad, raza, nutrición, características genéticas, estado inmunológico del humano y re-infecciones (Bielefeldt, 1997).

1.2 El vector

El virus del dengue es transmitido a los humanos por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (Fig.1) y *Aedes albopictus*. Este género está extensamente distribuido dentro de los límites entre los 40° Norte y 40° Sur de latitud y a una cota no mayor a 1600 metros sobre el nivel del mar, aunque en la actualidad se han ido adaptando a alturas por encima de la señalada, lo que los convierte en una seria amenaza de trasmisión en lugares donde generalmente no existía. (Reiter, 2001).



Figura 1. *Aedes aegypti* (<http://upload.wikimedia.org>).

El ciclo endémico y epidémico del DEN es mantenido por el vector a través de la transmisión al hombre, siendo este el hospedero definitivo y reservorio del virus. La intensidad y tiempo de la transmisión dependen de la abundancia del vector y la presencia de humanos infectados (Bielefeldt, 1997).

La densidad, multiplicación y distribución del mosquito son favorecidas por la urbanización creciente, el saneamiento deficiente, el inadecuado almacenamiento de agua, debido al movimiento de viajeros de áreas endémicas y a la virulencia y circulación de múltiples serotipos virales. Así mismo, las variaciones climatológicas como el aumento de la temperatura y las precipitaciones fluviales pueden alterar la distribución geográfica del vector (Fig. 2) y pueden estar relacionados con el aumento de casos de FHD en áreas endémicas (Rodríguez y Marzal, 2004).



Figura 2. Distribución geográfica del virus del dengue en el año 2009 (área sombreada).
(http://organismos.chubut.gov.ar/cambioclimatico/files/2009/Mapa_dengue.jpg)

1.3 El agente etiológico

El agente causal de la enfermedad por dengue es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Su genoma es una molécula de RNA de cadena sencilla en sentido positivo y tiene una longitud de 10.7 kilobases, esta molécula da lugar a 3 proteínas estructurales: la proteína de envoltura (E), la de pre-membrana/membrana (prM/M) y la proteína de cápside (C) (Fig. 3) y a 7 proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5, que son altamente conservadas entre los flavivirus (Rothman, 2004).

El virión es envuelto y está compuesto por un 6% de RNA, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos (Rice, 1996).

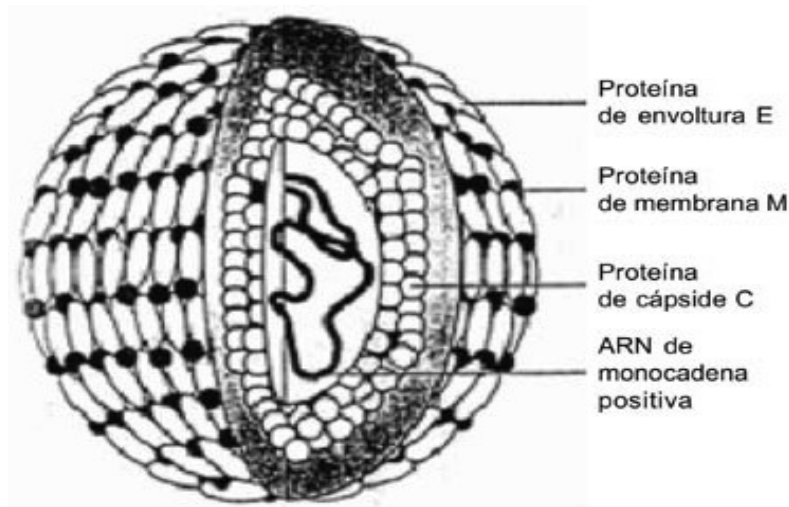


Figura 3. Estructura del virus del dengue.

Tomado de: <http://www.tecnologiahecha-palabra.com/salud/especialidades/articulo.asp>

1.4 Estrategia de replicación del virus

El virus se multiplica en el epitelio intestinal y glándulas salivales del mosquito hembra, que permanece infectado toda su vida. Luego de 7 a 14 días de incubación, el mosquito puede infectar al hombre por medio de la picadura (Gubler, 1998; Rice, 1996). En los humanos, se ha descrito que los monocitos constituyen la célula blanco principal para el virus, ya que hay reportes de que es capaz de replicarse tanto en células mononucleares de sangre periférica humana como en líneas celulares de monocitos/macrófagos humanos, tales como U937 y TPH-1 (Brant y col. 1982; Liu y col, 1991; Anderson y col, 1997), sin embargo, también existe evidencia de que el virus puede replicarse en células dendríticas, en linfocitos T y en Linfocitos B (Navarro y col, 2005). La presencia de antígeno viral ha sido reportada en células hepáticas y tejido neuronal de pacientes que padecieron FHD y SCD, sugiriendo la posible replicación del virus en estas células (Marianneau y col, 1997; Marianneau y col, 1999).

La entrada del virus se inicia con la unión y la penetración a la célula hospedera, durante la unión, la proteína E se une a receptores específicos en la célula blanco, siendo DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule (ICAM) 3-grabbing nonintegrin*) el que se ha descrito como el principal receptor (Boonrat y col, 2003). La entrada ocurre por un proceso de endocitosis mediada por receptor en una vesícula endosomal, en la cual la envoltura viral se fusiona con la membrana celular. La fusión de membranas es causada por una disminución de pH, dando lugar a cambios conformacionales y exposición del dominio fusogénico de la proteína E dentro de la vesícula y termina con la liberación del genoma viral hacia el citoplasma (Rice, 1996; Monath y Heinz, 1996).

Una vez que el RNA es liberado en el citoplasma, queda expuesto a la maquinaria de traducción de la célula en el retículo endoplásmico (RE) y se inicia la replicación del virus. El RNA viral es leído como único mensajero y traducido directamente en una poliproteína, luego, la cadena negativa complementaria es sintetizada por la polimerasa viral (NS5) y sirve de molde para formar el genoma completo, el cual puede ser traducido, replicado a cadena negativa o encapsulado en un nuevo virión (Hung y col, 1999, Monath y Heinz, 1996). El ensamblaje del virión se inicia en el lumen del RE, cuando el genoma RNA (+) se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside y adquiere la envoltura del RE hospedero. El ensamblaje continúa en vesículas intracelulares derivadas del RE, con abundante proliferación de estructuras de membrana y con una rápida maduración del virión. Dichas vesículas transportan a los viriones inmaduros hacia la membrana plasmática de la célula hospedera (Hung y col, 1999) mientras que los viriones maduran, posteriormente las vesículas logran fusionarse con la membrana celular, permitiendo que los viriones maduros sean liberados al espacio extracelular por medio de un proceso de exocitosis (fig. 4).

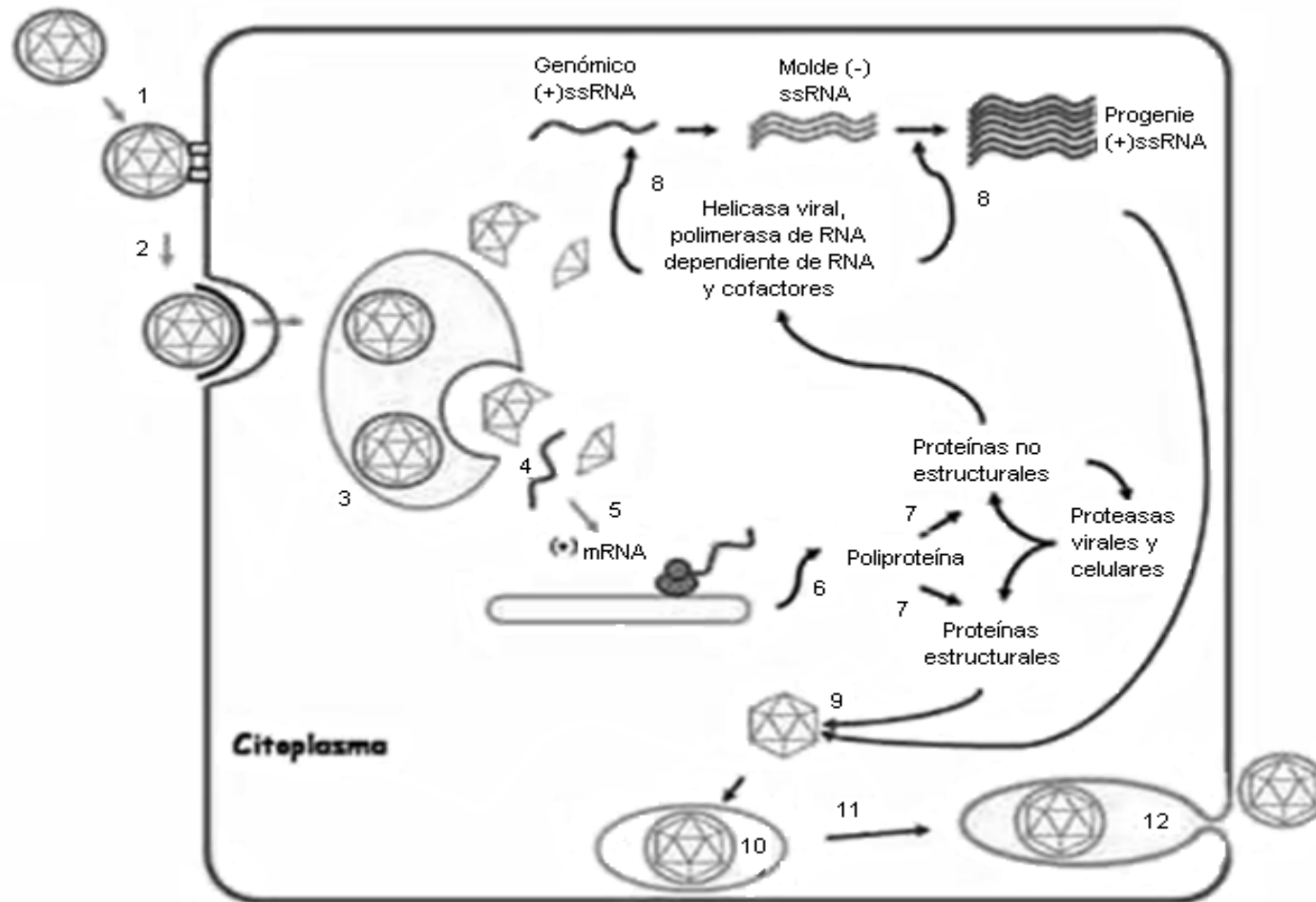


Figura 4. Ciclo replicativo del virus del dengue: 1) Unión, 2) Entrada, 3) Fusión membranal, 4) y 5) Liberación del RNA viral, 6) Traducción, 7) Procesamiento de la poliproteína, 8) Replicación viral 9) Ensamblaje, 10) Maduración, 11) Transporte vesicular y 12) liberación (www.mex.ops-oms.org/documentos/dengue/entrada.pdf).

1.5 Situación en México

En México, las áreas de más alto riesgo para la transmisión la enfermedad son aquellas que rodean las costas del país (Fig. 5), sin embargo, el vector cada vez se adapta a lugares con altitud mayor a 1600msnm y gradualmente está invadiendo nichos fuera de las regiones tropicales y subtropicales.

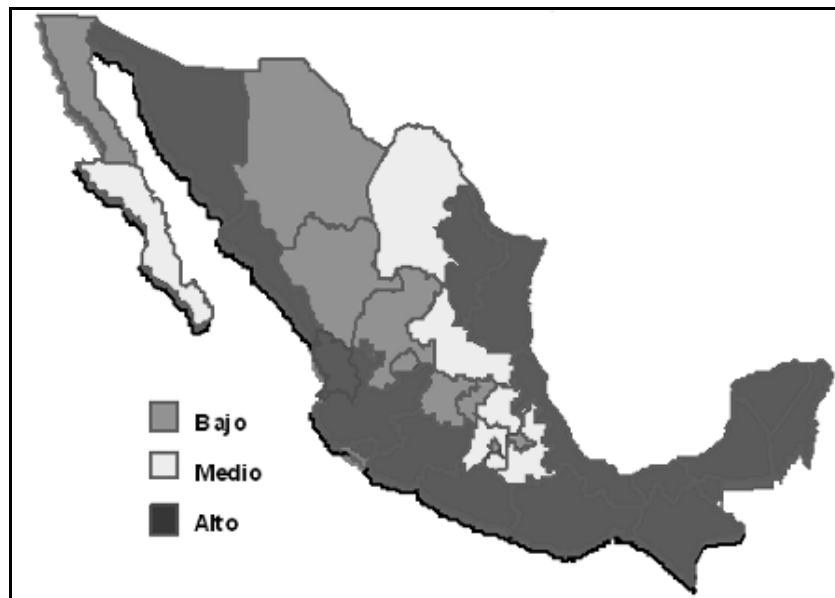


Figura 5. Riesgo de transmisión de dengue en la República Mexicana.

(www.cenave.gob.mx/dengue)

Hasta la semana 30 del año 2009, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) de la Secretaría de Salud reportó 9,651 casos confirmados por DEN, de los cuales 7,993 fueron FD y 1,658 casos de FHD, siendo Colima, Michoacán, Guerrero, Nayarit y Veracruz los estados que más casos confirmados reportaron (www.dgepi.salud.gob.mx), concentrando más del 60% de los casos. Por lo anterior se hace evidente la necesidad de contar con sistemas de diagnóstico que permitan manejar de forma adecuada el alto número de muestras que deben ser analizadas anualmente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diagnóstico de dengue

La importancia del diagnóstico de casos de dengue radica en dar el seguimiento epidemiológico y oportuno de la enfermedad; por un lado, es importante establecer el diagnóstico durante los primeros días de sintomatología clínica para dar el tratamiento de soporte y por otro, se debe hacer la determinación del serotipo viral para controlar la introducción de un serotipo nunca aislado en una región determinada.

Para realizar el diagnóstico de laboratorio de dengue, los métodos empleados son los siguientes:

- Aislamiento viral.
- Retrotranscripción - reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).
- Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) de captura de antígeno NS1.
- ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos.

El diagnóstico por aislamiento viral se considera el estándar de oro, ya que es muy efectivo y se puede detectar el serotipo presente, aunque tiene la desventaja de que requiere de un gran consumo de tiempo y es utilizado solo con muestras que son tomadas dentro de los primeros 5 días de haber iniciado las manifestaciones clínicas (fase aguda). Las muestras sospechosas son analizadas por aislamiento en la línea celular de mosquito C6/36 y 7 días después se identifica el serotipo infectante mediante el uso de anticuerpos específicos marcados con fluorocromos para ensayos de inmunofluorescencia (IFA). La detección del genoma viral por RT-PCR es un método muy sensible, específico y rápido, además de que permite identificar el serotipo infectante. Debido a su alto costo se hace difícil su uso a gran escala, por lo que solo se utiliza en los casos sospechosos de FHD.

La detección de antígeno viral (proteína NS1) y anticuerpos específicos IgM y/o IgG para el virus del dengue por ELISA en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, respectivamente, son las técnicas más usadas por sus características de sencillez, alta especificidad y sensibilidad, bajo consumo de tiempo y relativamente bajo costo. Aunque cabe destacar que no son capaces de identificar al serotipo infectante (Vaughn y col, 1997; Alcon y col., 2002).

Anteriormente, la prueba inmediata para la confirmación de DEN era el aislamiento viral, aplicado a las muestras sospechosas en fase aguda de la enfermedad pero con el hallazgo de que la proteína viral NS1 se produce en forma soluble y se encuentra en el suero de pacientes infectados (Dussart y col, 2008), el algoritmo para el diagnóstico cambió, de tal manera que ahora las muestras séricas de casos que se encuentran dentro de los primeros 5 días de la enfermedad (fase aguda), pueden ser evaluados por un ELISA comercial para la identificación de la proteína viral NS1, los casos positivos se dan como confirmados y son inoculados posteriormente en cultivos celulares para el aislamiento e identificación de serotipo; los casos negativos se analizan para la detección de anticuerpos IgG para la identificación de infecciones secundarias. Los sueros que corresponden a fase convaleciente (posterior al día 6), son analizados para la búsqueda de anticuerpos IgM y en caso de ser positivos se dan también como confirmados, en tanto que los negativos se analizan para anticuerpos IgG, un resultado positivo es también confirmatorio de la enfermedad y de una infección primaria (Fig. 6) (www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manuales/Man19-Dengue/Man19.htm).

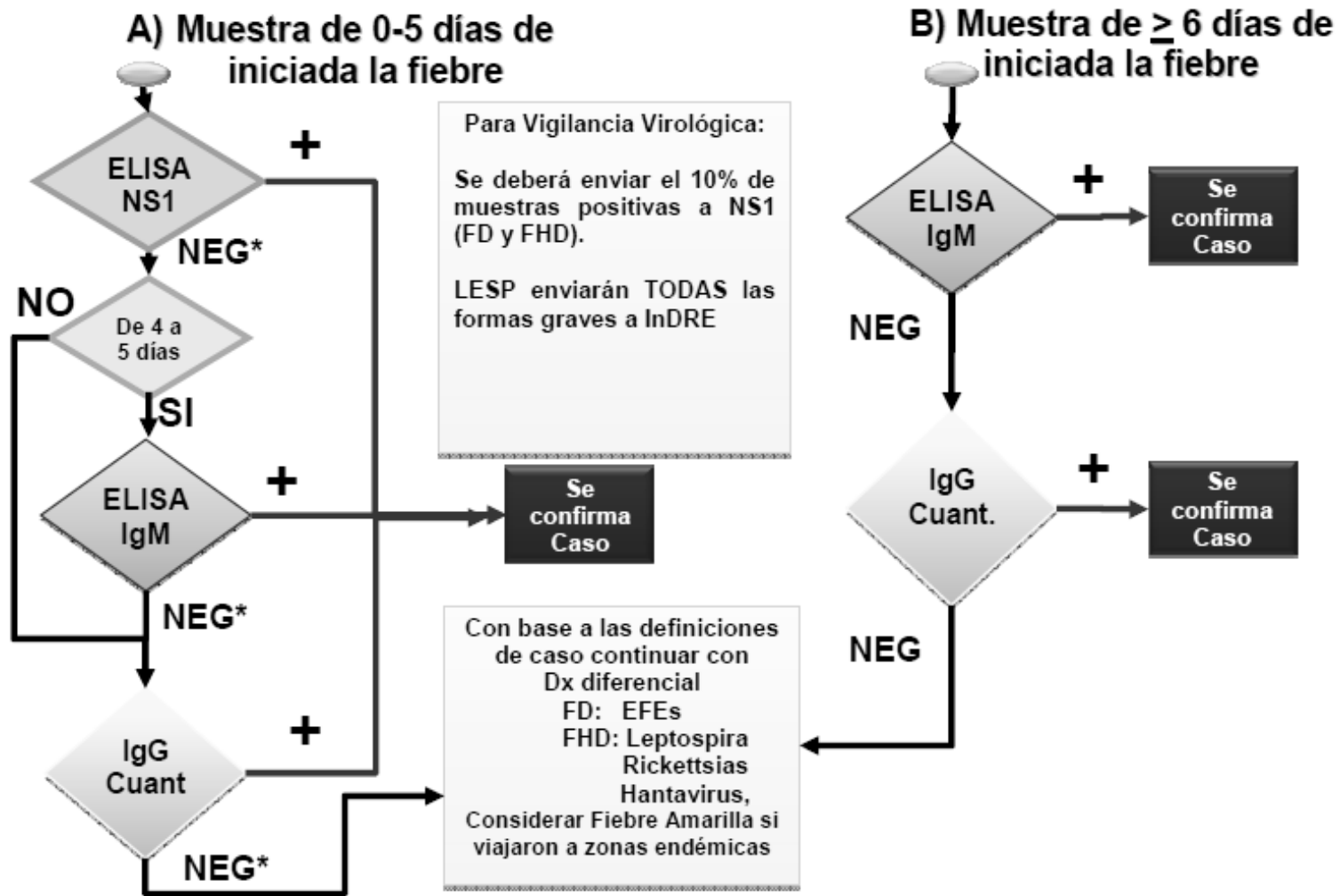


Figura 6. Algoritmo vigente en el año 2009 para el diagnóstico de laboratorio de FD y FHD (www.salud.gob.mx).

2.2 La proteína no estructural NS1

La proteína NS1 es una glicoproteína de 46-50 kDa que no forma parte de la estructura del virión, pero se expresa durante su ciclo de replicación en la superficie de las células infectadas, asociada a la membrana de organelos celulares y también puede ser secretada al medio (sNS1) en forma de dímeros (en células de mosquito) o hexámeros (en células de mamíferos). Debido a estas razones la proteína NS1 ha sido ampliamente estudiada, lo que ha permitido reconocerla como un inmunógeno importante en las infecciones por dengue y se ha demostrado que tiene un papel importante en la protección contra la enfermedad, por lo que ha cobrado relevancia en los proyectos de elaboración de vacunas y en el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en su detección (Shamala y col, 2007. Pei y col, 2003).

En los últimos años se ha demostrado que los niveles séricos de sNS1 en pacientes infectados por virus del dengue varían entre las personas durante el curso de la enfermedad, reportándose casos con altos niveles de sNS1 en pacientes que experimentan tanto primera como segunda infección por dengue durante la fase aguda de la enfermedad y en los primeros días de convalecencia (Alcon, 2002).

2.3 Determinación y uso de la proteína NS1 para el diagnóstico de dengue

En la actualidad el algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de dengue señala como primera elección la identificación de la glicoproteína NS1 en los casos en la fase de viremia. Para realizar dicha identificación se han desarrollado múltiples ELISA's, los cuales se basan en el empleo de anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales contra la proteína NS1 que reconocen distintos epítomos de ésta, las metodologías son costeables, sensibles y de alta especificidad, sin embargo, los ensayos no aportan la practicidad de un diagnóstico que cubra la serotipificación del virus.

Entre las pruebas comerciales más usadas se encuentran Platelia (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, Francia) y pan-E (Panbio, Brisbane, Australia), ambas se basan en la detección de la proteína NS1 en suero por ELISA de captura, aunque también se encuentran en el mercado pruebas de inmunocromatografía, que muestran al igual que la prueba pan-E una sensibilidad inferior a la de Platelia por lo que esta es la de mayor uso en los centros de diagnóstico de todo el mundo (Young y col., 2000; Alcon y col., 2002; Pei y col., 2003; Dussart y col., 2006; Kumarasamy y col., 2007; Ludert y col., 2008).

Se ha demostrado que Platelia muestra una sensibilidad de entre el 88 y el 97% y una especificidad del 100% en la detección del antígeno dentro de la fase aguda de la enfermedad, que corresponden al periodo de viremia, estos estudios de validación se han llevado a cabo en población de Francia (Dussart y col, 2008), Tailandia (Ubol, 2008), Malasia (Falconar, 2007), China (Xu y col, 2006) y la Guyana Francesa (Alcon, 2002), sin embargo, hasta el momento no se han publicado evaluaciones para verificar la sensibilidad y especificidad en población mexicana y tampoco se ha evaluado la capacidad de este equipo para identificar a la NS1 en los días posteriores al periodo de viremia.

Entre las pruebas comerciales más usadas se encuentran Platelia (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, Francia) y pan-E (Panbio, Brisbane, Australia), ambas se basan en la detección de la proteína NS1 en suero por ELISA de captura, aunque también se encuentran en el mercado pruebas de inmunocromatografía, que muestran al igual que la prueba pan-E una sensibilidad inferior a la de Platelia por lo que esta es la de mayor uso en los centros de diagnóstico de todo el mundo (Young y col., 2000; Alcon y col., 2002; Pei y col., 2003; Dussart y col., 2006; Kumarasamy y col., 2007; Ludert y col., 2008).

Se ha demostrado que Platelia muestra una sensibilidad de entre el 88 y el 97% y una especificidad del 100% en la detección del antígeno dentro de la fase aguda de la enfermedad, que corresponden al periodo de viremia, estos estudios de validación se han llevado a cabo en población de Francia (Dussart y col, 2008), Tailandia (Ubol, 2008), Malasia (Falconar, 2007), China (Xu y col, 2006) y la Guyana Francesa (Alcon, 2002), sin embargo, hasta el momento no se han publicado evaluaciones para verificar la sensibilidad y especificidad en población mexicana y tampoco se ha evaluado la capacidad de este equipo para identificar a la NS1 en los días posteriores al periodo de viremia.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la detección de la proteína NS1 viral en el suero de pacientes con diagnóstico presuntivo de dengue ha sido descrita como el método de elección para el diagnóstico oportuno y confirmatorio de la infección en fase aguda, sin embargo, la mayoría de las muestras para diagnóstico son obtenidas durante la fase convaleciente de la enfermedad, por lo que en este trabajo se pretende describir el tiempo de prevalencia de la proteína NS1 más allá de la etapa de viremia y su probable valor diagnóstico en la población mexicana.

4. HIPÓTESIS

La proteína NS1 del virus del dengue es detectable no solo en la fase aguda de la enfermedad, sino también en la fase convaleciente.

5. OBJETIVOS

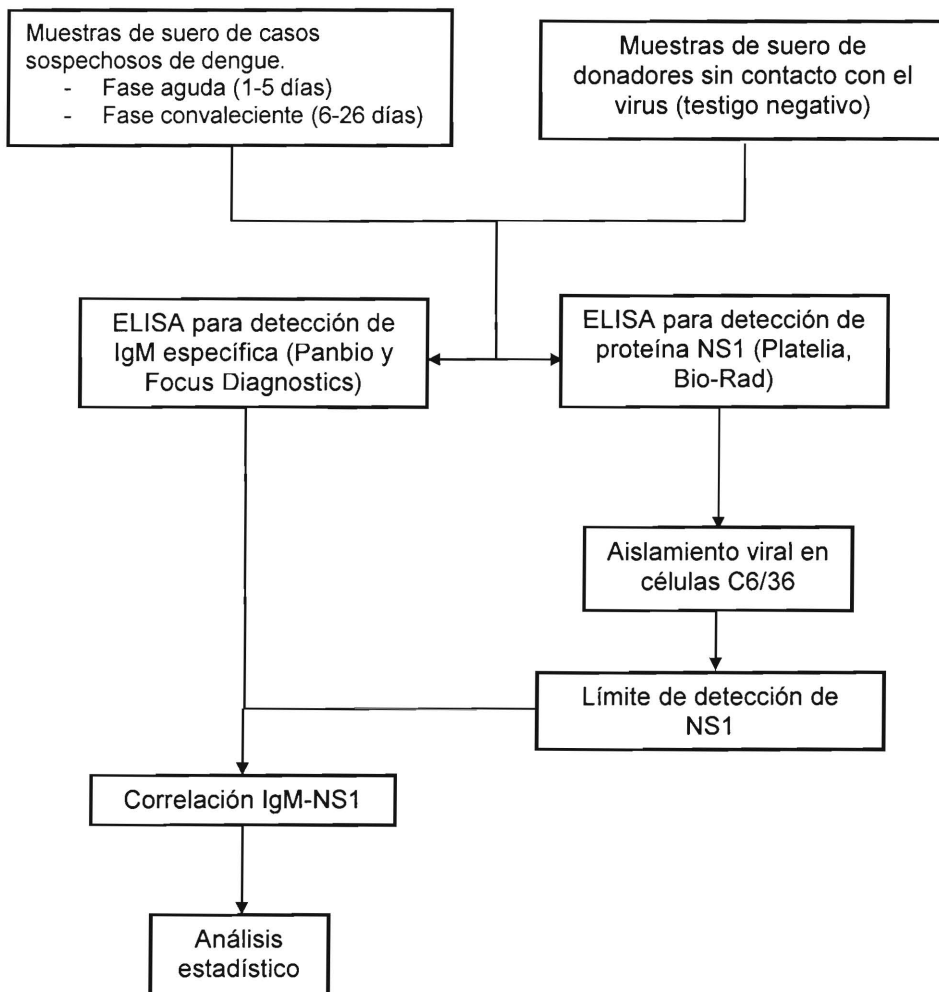
5.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de la proteína NS1 del virus del dengue en sueros de pacientes en fase aguda y convaleciente de la enfermedad mediante un ELISA comercial para establecer el tiempo límite de su detección y los valores diagnósticos en población mexicana.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener sueros de pacientes confirmados como positivos a infección por virus del dengue con toma de muestra entre el día 1 y 26 después de haber iniciado los síntomas de la enfermedad.
2. Determinar la presencia de la proteína NS1 viral en las muestras seleccionadas mediante un ELISA comercial (Platelia) y la presencia de anticuerpos específicos IgM mediante un ELISA de captura (Panbio y Focus Diagnostics).
3. Establecer la correlación entre la aparición de los anticuerpos IgM específicos contra el virus del dengue y la presencia de la proteína NS1 en los mismos.
4. Evaluar la presencia de viriones infectivos en muestras séricas de fase aguda positivas a la proteína NS1 y almacenadas a 4°C.
5. Realizar el análisis estadístico de los resultados para evaluar los límites de detección de la proteína NS1 en la fase convaleciente.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Selección de sueros

Se emplearon muestras séricas de pacientes en fase aguda y convaleciente (antes y después de 5 días de iniciadas las manifestaciones clínicas, respectivamente) confirmadas con infección por el virus de dengue mediante aislamiento o serología y donadas por el Departamento de Virología del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Veracruz (LESP-Ver), las cuales correspondían al diagnóstico del año 2008 y se encontraban almacenadas a 4°C. También se emplearon muestras de donadores sanos del Distrito Federal (zona no endémica). Los criterios de inclusión de las muestras fueron la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica, hemólisis o lipemia. Se incluyó como máximo un total de 10 sueros por día.

7.2 ELISA para la determinación de antígeno viral (proteína NS1)

En los sueros seleccionados se determinó la presencia de la proteína NS1 del virus de dengue mediante ELISA, para ello se empleó el equipo comercial Platelia (Bio-Rad, 2006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se adicionaron directamente 50µL de cada suero en placas de 96 pozos sensibilizados con anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-proteína NS1, 50µL diluyente para suero (PBS-Tween 20 al 0.01%) y 100µL de conjugado (AcMo anti-NS1-peroxidasa) y la placa se incubó durante 90min a 37°C. Trascurrido el tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con amortiguador de lavado (Tris-NaCl pH 7.4-Tween 20 al 1%), posteriormente se adicionaron 160µL de solución reveladora (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) al 0.25% - dimetilsulfóxido al 4% -H₂O₂ al 0.15% - amortiguador de citratos pH 3.5-3.8)) a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30min y protegida de la luz. Después de la incubación se agregaron 100µL de solución de paro (H₂SO₄ 1N) en cada pozo,

incubado durante 30min para posteriormente leer la densidad óptica (DO) o absorbancia (A) a 450nm en un lector de microplacas modelo 3550 de Bio-Rad.

7.3 ELISA para la determinación de anticuerpos específicos IgM contra el virus del dengue

A los sueros seleccionados les fue determinada la presencia de anticuerpos de tipo IgM contra el virus del dengue mediante el uso de dos ELISA's comerciales (Panbio y Focus Diagnostics).

Para el equipo Panbio los sueros se diluyeron 1:100, se depositaron 100µL de la dilución en pozos que contenían AcMo anti-IgM humana, se incubaron durante 1h a 37°C y posteriormente se realizaron 6 lavados con amortiguador Tris-NaCl pH 7.4, se adicionaron 100µL de una mezcla de antígeno (Ag) y AcMo-peroxidasa 1:1 y se incubó durante 1h a 37°C. Finalmente se repitieron los lavados y se adicionaron 100µL de solución reveladora de TMB, se incubó por 10min a temperatura ambiente y se adicionaron 100µL solución de paro para leer las DO de cada pozo a 450nm en el lector de microplacas.

Para realizar la técnica establecida por el equipo comercial de Focus Diagnostics, se designaron 2 pozos como blanco (sin muestra sérica). Cada suero se diluyó previamente 1:101, del cual se depositaron 100µL en pozos que contenían AcMo anti-IgM humana o con 100 µL de diluyente para los pozos designados como "blanco", se cubrió la placa y se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados, se adicionaron 100µL de solución de antígeno viral de dengue (serotipos 1-4), se incubó por 2h a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados. Se depositaron 100µL del conjugado-peroxidasa, se incubó durante 30min a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados. Finalmente se adicionaron 100µL de solución reveladora, la placa se incubó 10min a temperatura ambiente y se añadieron 100µL de solución de paro para leer las DO de cada pozo en un lector de microplacas a 450 nm.

7.4 Inmunofluorescencia directa.

Un total de 10 sueros en fase aguda confirmados como positivos a dengue mediante la identificación de la proteína NS1, fueron inoculados a razón de 100µL de cada uno en tubos de cultivo individuales con monocapas confluentes de células C6/36. Como testigo positivo se inoculó con 10 MOI (multiplicidad de Infección) de la cepa prototipo DEN-2 Nueva Guinea y como testigo negativo se inoculó el suero de un donador no inmune para dengue. Los sistemas se incubaron a 28°C durante 7 días.

Posteriormente, las células se despegaron mecánicamente de cada tubo y se centrifugaron a 300xg durante 10 min. Se decantó el medio, las células se resuspendieron y se adicionaron 20 µL de suspensión celular en el pozo correspondiente sobre portaobjetos para inmunofluorescencia, las laminillas se secaron a temperatura ambiente. Inmediatamente las células se fijaron en acetona fría por 20min, se lavaron con PBS y se adicionaron 20µL de anticuerpo anti-proteína E-FITC, se incubaron durante 20min a 37°C y se realizaron los lavados correspondientes. Las laminillas fueron montadas con VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame CA, EEUU) en un cubreobjetos y fueron analizadas por microscopía de fluorescencia.

7.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el modelo de regresión logística y los valores de probabilidad obtenidos mediante curvas ROC utilizando el programa GRAPH ROC para Windows.

8. Resultados

Se analizaron un total de 220 muestras séricas de pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue, de las cuales 50 fueron de pacientes en fase aguda y 170 muestras de pacientes en fase convaleciente. También se analizaron 3 muestras de donadores sanos de zona no endémica.

8.1 Determinación de la proteína NS1 por ELISA

Para obtener el resultado definitivo de las determinaciones de proteína NS1 viral, se llevaron a cabo una serie de cálculos tomando en cuenta los valores de DO del testigo positivo, testigo negativo y testigo umbral incluidos en el equipo, lo que permitió establecer los valores de corte de la prueba siguiendo el procedimiento que se ejemplifica a continuación:

1. Se obtienen las DO de los testigos de la prueba y las muestras.
2. El proveedor señala que se deben de hacer los siguientes cálculos para obtener los valores de corte:

	DO
Testigo +	0.335
U 1	0.283
U 2	0.164
Testigo -	0.087

(U) Valor umbral

CO= Punto de corte = (promedio de las 2 DO de los U) > 0.2

$$CO = (0.283 + 0.163) / 2 = 0.22$$

$$0.22 > 0.2$$

Testigo negativo: (DO del testigo negativo/CO) < 0.4

Testigo negativo= $0.087/0.22= 0.39$

$0.39 < 0.4$

Testigo positivo: (DO del testigo positivo/CO) > 1.5

Testigo positivo= $0.335/0.22= 1.52$

$1.52 > 1.5$

3. Para determinar si la muestra es positiva, dudosa o negativa se tomaron en cuenta los siguientes valores, después de haber sido tratados los resultados:

Negativo: $(DO/CO) < 0.5$

Dudoso: $0.5 \leq (DO/CO) \leq 1.0$

Positivo: $(DO/CO) > 1.0$

4. Tratamiento de resultados:

Muestra	DO/CO	RESULTADO
5405	$2.335/0.22= 10.61$	+
3211	$0.218 / 0.22 = 0.99$	D
264	$0.086 / 0.22 = 0.39$	-

(+) Positivo, (D) Dudoso, (-) Negativo

Con base en lo anterior se procesaron todas las muestras; los resultados obtenidos (Tablas 1 y 2) hacen evidente que durante la fase aguda se obtiene entre un 90 y 100% de detección de la proteína en las muestras séricas, misma que fue disminuyendo en los sueros de fase convaleciente, siendo detectable hasta un 60% en el día 11 y dejando de ser detectada a partir del día 17.

8.2 Evaluación de sueros por ELISA para la determinación de anticuerpos IgM contra el virus del dengue

En la determinación de anticuerpos específicos IgM contra el virus, se obtuvieron resultados a partir de dos ELISA comerciales (Panbio y Focus Diagnostics), en los cuales se indica el procedimiento matemático para la calibración de cada uno con para establecer el valor de corte.

Para el equipo de Panbio se consideraron las DO del testigo positivo, testigo negativo y testigo umbral (este último por triplicado):

1. El proveedor proporciona los siguientes datos (que varían según el lote de fabricación) y operaciones para asegurar que la validación completa del equipo sea de calidad y a su vez que los cálculos (paso 3 y 4) sean los adecuados:

Factor de calibración (FC): 0.56

DO testigo negativo \leq 3.000

Valor de corte = (promedio de los 3 U) x FC

Valor de corte \geq 1.5 X DO testigo negativo

Valor de corte positivo: $1.1 \leq$ DO \leq 6.0

2. Se obtienen las DO de los testigos de la prueba y las muestras.

3. Obtención de los valores de corte:

	DO
Testigo -	0.118
U 1	0.672
U 2	0.731
U 3	0.785
Testigo +	1.642

Factor de calibración (FC): 0.56

DO testigo negativo ≤ 3.000

$$0.118 \leq 3.000$$

Valor de corte = (promedio de los 3 U) x FC

$$\text{Valor de corte} = [(0.672 + 0.731 + 0.785) / 3] \times [0.56]$$

$$\text{Valor de corte} = 0.729 \times 0.56 = 0.40$$

Valor de corte $\geq 1.5 \times \text{DO de testigo negativo}$

$$0.40 \geq 1.5 \times 0.118$$

$$0.40 \geq 0.23$$

Valor de corte positivo: $1.1 \leq \text{DO} \leq 6.0$

$$1.1 \leq 1.642 \leq 6.0$$

4. Para determinar si la muestra es positiva, dudosa o negativa se tomaron en cuenta los siguientes valores, después de haber sido tratados los resultados:

Negativo: $[(\text{DO}/\text{CO}) \times 10] < 9.0$

Dudoso: $9.0 \leq [(\text{DO}/\text{CO}) \times 10] \leq 11.0$

Positivo: $[(\text{DO}/\text{CO}) \times 10] > 11.0$

5. Tratamiento de resultados:

Muestra	(DO/CO) X 10	RESULTADO
2990	$(0.408 / 0.4) \times 10 = 10.2$	D
3938	$(0.206 / 0.4) \times 10 = 5.15$	-
752	$(2.933 / 0.4) \times 10 = 73.325$	+

El equipo de Focus Diagnostics para anticuerpos específicos IgM contra dengue indica que debe realizarse una curva de calibración para obtener los valores de corte:

1. Se obtienen las DO de los testigos de la prueba y las muestras (calibradas anteriormente con los pozos "blanco").

2. Cálculos para obtener los valores de corte:

	DO
Testigo -	0.019
U 1	0.039
U 2	0.018
Testigo ++	0.485
Testigo +	0.059

(++) Testigo alto positivo; (+) Testigo bajo positivo

CO= Punto de corte = (promedio de las 2 DO de los U) < 0.1

$CO = (0.039 + 0.018) / 2 = 0.057 / 2 = 0.028$

$0.028 < 0.1$

Testigo negativo: (DO del testigo negativo/CO) < 0.8

Testigo negativo= $0.019 / 0.028 = 0.67$

$0.67 < 0.8$

Testigo alto positivo: (DO del testigo positivo/CO) > 3.5

Testigo positivo= $0.485 / 0.028 = 17.32$

$17.32 > 3.5$

Testigo bajo positivo: $1.5 \leq$ (DO del testigo positivo/CO) \leq 3.5

Testigo positivo= $0.059 / 0.028 = 2.10$

$1.5 \leq 2.10 \leq 3.5$

3. Para determinar si la muestra es positiva o negativa se tomaron en cuenta los siguientes valores, después de haber sido tratados los resultados:

Negativo: $(DO/CO) < 1.0$

Positivo: $(DO/CO) > 1.0$

4. Tratamiento de resultados:

Muestra	DO/CO	RESULTADO
3016	$0.020 / 0.028 = 0.71$	-
5622	$0.229 / 0.028 = 8.17$	+

De acuerdo a estos criterios se analizaron todas las muestras de suero para la determinación de anticuerpos IgM y los resultados obtenidos indican un incremento de anticuerpos séricos a partir del cuarto día después de haberse manifestado los síntomas de la infección por virus del dengue (Tabla 1).

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
2832	1	0.410	+	0.232	-
<u>2990</u>		2.407	+	0.408	-
3016*		2.489	+	0.020	-
3971*		2.194	+	0.027	-
3972*		2.342	+	0.017	-
<u>3975*</u>		2.918	+	0.012	-
3976*		2.391	+	0.013	-
5405*		2.335	+	0.019	-
5591*		2.398	+	0.025	-
5622*		2.348	+	0.229	+
<u>2938</u>		2	0.372	+	0.206
2939	0.335		-	0.227	-
3105*	2.586		+	0.012	-
3189*	2.555		+	0.011	-
3198*	2.392		+	0.023	-
5438*	2.461		+	0.017	-
5498*	2.289		+	0.019	-
5500*	2.650		+	0.018	-
5558*	0.317		+	0.028	-
<u>5796*</u>	1.797		+	0.027	-
<u>2818</u>	3	0.396	+	1.036	+
<u>2865</u>		2.639	+	0.268	-
3104*		2.141	+	0.022	-
3184*		2.238	+	0.012	-
5350*		1.148	+	0.020	-
5494*		2.203	+	0.017	-
5516*		2.408	+	0.023	-
5578*		2.275	+	0.020	-
5590*		2.587	+	0.025	-
5698*		2.850	+	0.021	-

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
2910	4	0.354	-	0.995	+
3015		2.243	+	0.258	-
3185*		2.336	+	0.017	-
5351*		2.904	+	0.031	+
5446*		2.339	+	0.016	-
5509*		2.915	+	0.012	-
5544*		2.341	+	0.072	+
<u>5688*</u>		1.826	+	0.014	-
5735*		2.342	+	0.004	-
<u>5758*</u>		0.605	+	0.065	+
752	5	1.529	+	2.933	+
<u>2802</u>		2.492	+	2.315	+
2831*		2.489	+	0.092	+
2855*		2.177	+	0.015	-
3211*		0.218	-	0.455	+
5496*		2.241	+	0.101	+
5863*		0.597	+	0.786	+
5899*		2.069	+	0.050	+
6054*		0.231	+	0.387	+
<u>6268*</u>		2.553	+	0.015	-
060	6	0.156	-	1.677	+
213		1.254	+	≥ 3.000	+
2822		0.428	+	2.656	+
2854		2.292	+	0.910	+
2945		2.160	+	1.652	+
2953		2.638	+	≥ 3.000	+
3037		0.394	+	≥ 3.000	+
3137		0.285	-	1.315	+
3153		2.712	+	2.360	+
3156		0.352	-	2.950	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
362	7	1.302	+	≥ 3.000	+
363		1.330	+	≥ 3.000	+
385		0.318	-	≥ 3.000	+
496		2.358	+	≥ 3.000	+
2816		2.638	+	2.426	+
2877		2.396	+	2.949	+
2878		2.094	+	2.757	+
2880		0.685	+	1.488	+
3059		2.236	+	2.863	+
3132		0.571	+	2.502	+
076		8	0.185	-	≥ 3.000
077	0.621		+	≥ 3.000	+
097	2.356		+	0.892	+
100	0.253		-	≥ 3.000	+
102	0.223		-	0.763	+
127	0.264		+	≥ 3.000	+
132	0.182		-	2.455	+
133	0.308		-	≥ 3.000	+
134	0.436		+	≥ 3.000	+
137	0.736		+	≥ 3.000	+
001	9	0.931	+	≥ 3.000	+
002		0.255	-	≥ 3.000	+
006		2.590	+	≥ 3.000	+
008		1.105	+	≥ 3.000	+
014		1.637	+	≥ 3.000	+
019		0.230	-	2.467	+
021		1.506	+	≥ 3.000	+
022		≥ 3.000	+	≥ 3.000	+
035		1.743	+	≥ 3.000	+
040		≥ 3.000	+	1.512	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
003*	10	0.143	-	0.024	+
009		0.198	-	≥ 3.000	+
037		0.393	+	2.729	+
055		0.950	+	1.557	+
062		0.206	-	≥ 3.000	+
078		0.199	-	≥ 3.000	+
116		1.174	+	≥ 3.000	+
117		0.592	+	≥ 3.000	+
138		0.802	+	≥ 3.000	+
144		0.744	+	≥ 3.000	+
016		11	1.896	+	≥ 3.000
092	2.388		+	≥ 3.000	+
122	≥ 3.000		+	≥ 3.000	+
200	≥ 3.000		+	2.404	+
211	2.544		+	2.593	+
241	1.029		+	≥ 3.000	+
242	0.288		-	≥ 3.000	+
2914	0.233		-	2.359	+
3109	0.197		-	2.024	+
3110	0.314		-	2.603	+
023	12	1.162	+	2.947	+
044		1.588	+	2.332	+
141		0.172	-	≥ 3.000	+
171		0.228	-	≥ 3.000	+
277		0.247	-	≥ 3.000	+
336		1.458	+	2.042	+
340		1.257	+	1.030	+
352		0.115	-	1.021	+
378		0.116	-	≥ 3.000	+
386		0.110	-	≥ 3.000	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
034	13	0.266	-	1.951	+
067		0.139	-	2.594	+
196		0.129	-	≥ 3.000	+
293		0.096	-	≥ 3.000	+
338		2.637	+	2.055	+
3361		2.201	+	1.577	+
3482		2.408	+	1.396	+
3728		1.987	+	1.023	+
4434		2.037	+	1.833	+
5780		0.130	-	1.966	+
027		14	2.444	+	2.568
073	0.173		-	1.254	+
099	0.201		-	2.190	+
155	0.151		-	1.188	+
2891	0.193		-	1.333	+
3398	0.220		-	2.009	+
3710	0.230		-	1.445	+
3898	0.220		-	1.063	+
4006	0.195		-	1.339	+
4191	0.115		-	1.800	+
170	15	0.113	-	2.169	+
264		0.086	-	2.759	+
288		0.083	-	1.112	+
401		0.105	-	2.156	+
5267		0.098	-	1.960	+
5274		0.096	-	2.000	+
5323		0.111	-	1.656	+
5335		2.544	+	1.711	+
5548		0.121	-	1.531	+
5649		0.123	-	2.041	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
031	16	0.126	-	2.434	+
043		0.130	-	2.601	+
303		0.166	-	2.395	+
399		0.119	-	1.901	+
3394		2.591	+	1.774	+
3641		0.128	-	1.383	+
3886*		0.152	-	1.930	+
024	17	0.215	-	2.423	+
219		0.075	-	2.191	+
300		0.099	-	1.161	+
331		0.122	-	2.456	+
3227*		0.083	-	1.558	+
4041*		0.124	-	1.460	+
4305*		0.101	-	1.490	+
5275*		0.183	-	2.518	+
5454*		0.144	-	2.006	+
5744*	0.101	-	1.317	+	
025	18	0.156	-	2.253	+
244		0.099	-	2.295	+
484		0.250	-	1.182	+
624		0.177	-	1.152	+
3711*		0.148	-	2.581	+
3885*		0.074	-	2.569	+
4002*		0.134	-	1.700	+
4005*		0.166	-	1.051	+
4037*		0.117	-	1.074	+
4039*		0.120	-	1.288	+
251	19	0.128	-	2.934	+
398		0.122	-	0.814	+
402		0.132	-	1.199	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
5554*	19	0.102	-	1.290	+
5804*		0.127	-	1.209	+
6671*		0.108	-	1.416	+
6727*		0.183	-	1.066	+
103	20	0.168	-	0.922	+
108		0.166	-	1.054	+
252		0.146	-	1.008	+
299		0.164	-	1.181	+
4028*		0.109	-	1.120	+
4036*		0.112	-	1.160	+
4182*	21	0.166	-	0.993	+
5235*		0.182	-	1.006	+
5346*		0.180	-	1.117	+
5566*		0.077	-	1.092	+
273		0.137	-	1.039	+
296		0.182	-	1.009	+
4026*		0.139	-	0.732	+
5262*		0.127	-	0.772	+
5505*		0.167	-	0.810	+
5772*		0.169	-	1.028	+
5777*	0.166	-	1.066	+	
384	22	0.192	-	0.884	+
415		0.154	-	0.723	+
030	23	0.132	-	0.752	+
036		0.183	-	1.226	+
485		0.181	-	1.119	+
632		0.224	-	1.040	+
455	24	0.192	-	1.416	+
482		0.130	-	1.394	+
495		0.160	-	0.960	+

Muestra	Días de evolución	NS1		IgM	
		DO	Resultado	DO	Resultado
029	25	0.179	-	0.985	+
257		0.224	-	1.392	+
591		0.169	-	1.304	+
667		0.254	-	1.419	+
800		0.252	-	1.355	+
118	26	0.140	-	1.371	+
397		0.122	-	1.442	+
400		0.174	-	1.450	+
656		0.138	-	1.004	+
796		0.145	-	1.438	+
1	Sueros zona no endémica	0.141	-	0.173	-
2		0.135	-	0.167	-
3		0.098	-	0.358	-

Tabla 1. Interpretación de las DO obtenidas en la determinación de NS1 y anticuerpos específicos IgM.

*Muestras procesadas con el equipo Focus Diagnostics.

(+) La muestra se considera positiva.

(-) la muestra se considera negativa.

(D) la muestra se considera dudosa.

Los sueros subrayados se utilizaron para realizar la IFA directa para la identificación de proteína E en células C6/36.

8.3 Correlación de la expresión de la proteína NS1 del virus del dengue y la producción de anticuerpos IgM específicos en suero

Con la finalidad de establecer la correlación entre la aparición de anticuerpos IgM y la disminución en la detección de la proteína viral NS1, se obtuvo el porcentaje de muestras positivas en cada caso respecto a los días analizados, en la tabla 2 se muestra que al día 5 después de iniciada la sintomatología de la enfermedad, de 10 muestras analizadas, 9 aún fueron positivas para NS1 y 8 de esas 10 mismas muestras ya eran positivas para IgM.

A partir del día 6 se obtuvo un 100% de positividad en las muestras analizadas para IgM e inició la fluctuación en la identificación de NS1, siendo que para ese mismo día se detectó un 60%, en el día 7 un 90%, disminuyendo considerablemente en las muestras del día 8 a un 50% y variando nuevamente entre un 40 y 80% entre los días 9 al 13; en los días 14, 15 y 16 se observa solo una muestra positiva para cada uno y a partir de este día y hasta el día 26 ya no se encontró ninguna muestra positiva (figura 7).

Con base en lo anterior, se establecieron rangos de detección para NS1 en función de los días de evolución; en la tabla 3 se muestra que del día 1 al 5 se encontró una sensibilidad del 94%, en tanto que del día 6 al 9 se tiene una sensibilidad del 70%, del día 10 al 13 esta disminuye a un 52.5% y entre el día 14 a 16 es de 11.1%; a partir del día 17 se pierde totalmente la capacidad del equipo para detectar la presencia de la proteína en los sueros analizados.

Con la finalidad de establecer si los resultados obtenidos son confiables para la determinación de la proteína NS1 por este método, se empleó una curva ROC, con la cual se obtuvieron los parámetros de sensibilidad y especificidad tomando en cuenta los valores de DO/CO. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 4. La distribución de los datos, punto de corte y área bajo la curva, se muestran en la figura 8.

Días	NS1		IgM		Días	NS1		IgM	
	positivas	%	positivas	%		positivas	%	positivas	%
1	10/10	100	1/10	10	14	1/10	10	10/10	100
2	9/10	90	0/10	0	15	1/10	10	10/10	100
3	10/10	100	1/10	10	16	1/7	14.28	7/7	100
4	9/10	90	4/10	40	17	0/10	0	10/10	100
5	9/10	90	8/10	80	18	0/10	0	10/10	100
6	6/10	60	10/10	100	19	0/7	0	7/7	100
7	9/10	90	10/10	100	20	0/10	0	10/10	100
8	5/10	50	10/10	100	21	0/7	0	7/7	100
9	8/10	80	10/10	100	22	0/2	0	2/2	100
10	6/10	60	10/10	100	23	0/4	0	3/4	100
11	6/10	60	10/10	100	24	0/3	0	3/3	100
12	4/10	40	10/10	100	25	0/5	0	5/5	100
13	5/10	50	10/10	100	26	0/5	0	5/5	100

Tabla 2. Análisis porcentual de la expresión de la proteína NS1 y de anticuerpos IgM en los sueros analizados respecto al inicio de los síntomas de infección por dengue.

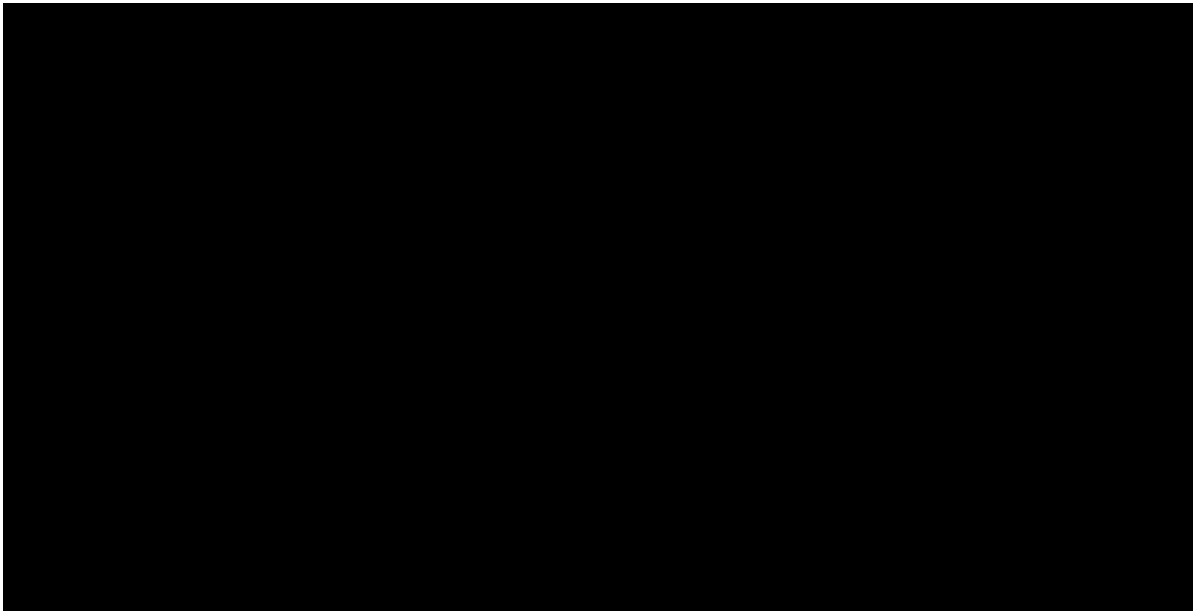


Figura 7. Gráfica porcentual de la expresión de la proteína NS1 y la producción de anticuerpos IgM específicos respecto a los días de evolución del dengue.

Día posterior a la aparición de la fiebre	Sensibilidad (%)
1 - 5	94
6 - 9	70
10 - 13	52.5
14 - 16	11.1
17 - 26	0

Tabla 3. Sensibilidad obtenida para el equipo Platelia con respecto al transcurso del dengue.

Valores de corte	Distribución relacionada a la población positiva a NS1 (día 1 a día9)	Distribución relacionada a la población negativa a NS1 (Día 11 a día 26)
Valor: 0.6000	Número de observaciones: 90	Número de observaciones: 130
Eficiencia: 0.8909	Media: 0.6536	Media: 5.3333
Sensibilidad: 0.8692		
Intervalo de confianza: 0.8095 – 0.9146	Desviación est: 4.2417	Desviación est: 1.1629
Especificidad: 0.9222		
Intervalo de confianza: 0.8573 – 0.9626	Límite menor: 0.2600	Límite menor: 0.2600
Nivel de confianza: 90 %		
Valor Predictivo Positivo: 0.9417	Límite mayor: 7.0500	Límite mayor: 13.2600
Valor Predictivo Negativo: 0.8300		

Tabla 4. Evaluación estadística del equipo Platelia.

Como se puede observar en la tabla 4, se obtuvo una especificidad del 92.22% y una sensibilidad del 86.92%; en la figura 8, el área bajo la curva de 0.91 indica una buena capacidad de la prueba para diferenciar entre falsos positivos y falsos negativos por lo que puede considerarse con valor diagnóstico significativo.

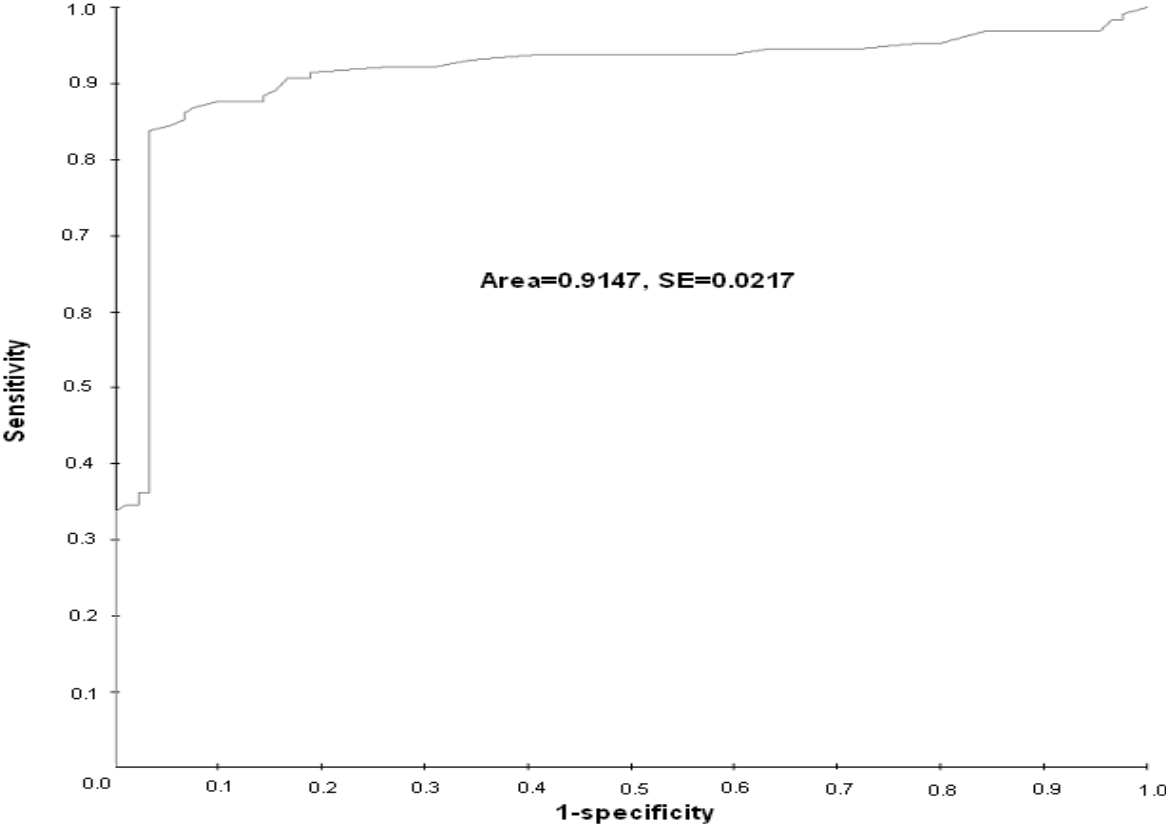


Figura 8. Curva NS1-ROC

8.4 Inmunofluorescencia directa para identificación de la proteína E viral en células C6/36 inoculadas con sueros de casos positivos a NS1

Con la finalidad de identificar la presencia de viriones infectivos en los sueros almacenados a 4°C durante lapsos de tiempo prolongados (un máximo de 1 año), se seleccionaron 10 sueros de fase aguda positivos a NS1 y se inocularon en la línea celular C6/36. En ninguno de los sueros analizados fue posible identificar la presencia de la glicoproteína E en la superficie de las células inoculadas, lo que implica que no fue posible recuperar viriones infectivos. En la figura 12 se muestran ejemplos representativos de las fluorescencias realizadas.

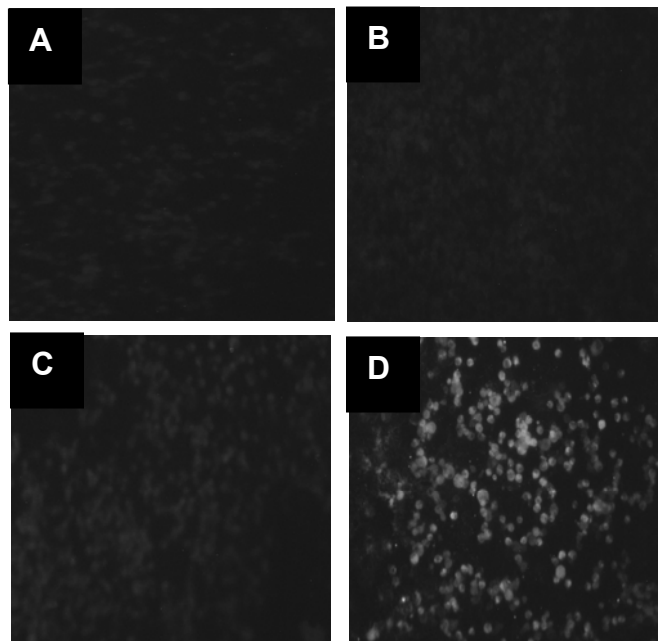


Figura 9. Células C6/36 inoculadas con sueros de fase aguda de dengue y marcadas con AcMo anti-proteína E-FITC. A) Suero de donador no inmune; B) Suero 3975 positivo a NS1, 1 día de evolución; C) Suero 6268, positivo a NS1, 5 días de evolución; D) Células inoculadas con DEN-2 Nueva Guinea (control positivo).

9. Discusión

El algoritmo vigente hasta el año 2009 para el diagnóstico de dengue, señala que el procedimiento serológico para las muestras tomadas entre los días 1 a 5 después del inicio del cuadro febril deben ser analizadas mediante la detección de antígeno viral NS1 y las muestras tomadas después de este tiempo deben ser analizadas mediante la detección de anticuerpos específicos IgM y/o IgG, ambos por ELISA, ya que la expresión de la proteína NS1 solo se expresa durante el periodo de viremia. Sin embargo, se desconoce el límite de detección de NS1 en sueros de pacientes posterior al tiempo establecido en el equipo comercial Platelia (Bio Rad). El objetivo de este proyecto fue establecer el límite de detección de la proteína NS1 en casos clínicos, así como establecer la correlación entre la expresión de la proteína y la identificación de anticuerpos IgM.

Se seleccionaron un total de 220 muestras de pacientes con sintomatología de dengue clásico, tomadas durante el periodo de octubre de 2007 a febrero de 2009, provenientes del LESP-Veracruz y almacenadas a 4 ° C para su conservación. Para facilitar el manejo de las muestras, se les reasignó la numeración y se elaboró una base de datos. En los casos donde fue posible, se analizaron 10 muestras para cada uno de los días que incluyó el estudio y en la tabla 2 se indica el número de sueros evaluados en cada caso. De estas muestras, 50 fueron tomadas en la fase aguda (del día 1 al 5) y 170 muestras fueron tomadas en la fase convaleciente.

Es importante señalar que estas muestras, una vez procesadas en el LESP-Veracruz, fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de la realización de las pruebas en nuestro laboratorio, lo que implicó su almacenamiento por poco más de un año; bajo estas condiciones fue posible reproducir los resultados previamente obtenidos en el laboratorio estatal; lo anterior significa que aún durante tiempos prolongados de almacenamiento la proteína NS1 permanece estable y puede ser identificada en el suero. Sin embargo, no fue posible

identificar desarrollo viral en tales muestras, lo implica que el virus no se mantuvo en condiciones infectivas y sugiere que fue degradado durante el tiempo de almacenamiento a la temperatura mencionada.

En estudios donde se evalúa la presencia de la proteína NS1, se utilizan sueros de bancos de hospitales o instituciones que los tienen preservados por varios años a -20°C . En un estudio publicado por Dussart y col. (2006), se evaluó el equipo Platelia con 239 sueros de casos positivos a dengue que correspondieron a muestras tomadas entre 1997 y 2005, en este caso las pruebas de serotipificación ya sea por cultivo celular o por RT-PCR fueron realizadas en el momento que se colectó la muestra; desafortunadamente, en el estudio llevado a cabo en este proyecto no se realizaron estas técnicas en el momento, debido a que ya se encontraba en vigencia el nuevo algoritmo que señala que las muestras positivas a NS1 en fase aguda se dan como caso confirmado y ya no es necesario identificar al serotipo, sino únicamente con fines de referencia en los laboratorios especializados. No obstante, se realizó la búsqueda de viriones infectivos con la finalidad de identificar al serotipo causante de la infección en los casos analizados sin encontrar en ninguno de los 10 sueros analizados la presencia del virus, que se realizó mediante la identificación de la proteína E expresada en cultivos celulares infectados.

Con respecto a la proteína NS1, el análisis realizado a los sueros correspondientes al primer día de evolución permitió su identificación en el total de los sueros evaluados, lo que reflejó una sensibilidad del 100%; en el estudio realizado por los fabricantes del equipo comercial, incluido en el inserto, señalan una sensibilidad del 87.8% para este tiempo. En el día 2 de la fase aguda, se identificó a la proteína en 9 sueros de los 10 evaluados dando una sensibilidad del 90% similar al 92.5% establecido en el inserto del equipo. Respecto al día 3 de esta misma fase, se identificó a la proteína en las 10 muestras analizadas, mostrando un 100% de sensibilidad contra un 95% reportado por el equipo referente al mismo día. Al día 4 fueron analizadas también 10 muestras de las

cuales a 9 se les detectó la proteína (90% de sensibilidad frente a 96.3 % reportado por el equipo). Al día 5, último día establecido para la detección de la proteína con este equipo, se obtuvo una sensibilidad del 90% (9 muestras positivas de 10 totales), en tanto que el equipo comercial reporta un 52.6% de sensibilidad en 19 sueros analizados. Lo anterior indica que bajo las condiciones en las que se realizó la prueba en nuestro laboratorio, el equipo tiene una sensibilidad alta para detectar muestras positivas en el límite considerado óptimo para su uso.

Los dos principales fabricantes de equipos para identificación de NS1, Bio-Rad y Panbio señalan un 35.7% de sensibilidad a partir del día 6 para el caso de Bio-Rad y menor a 58% para Panbio, ninguno de ellos hace un seguimiento día a día de la sensibilidad, por tal motivo, los resultados obtenidos en este proyecto son relevantes ya que permitieron establecer que al día 6 después de haber evolucionado la enfermedad (fase convaleciente) hay una sensibilidad del 60%, para el día 7 de 90%, disminuyendo a un 50% al día 8 y elevándose a un 80% al día 9. Con base en estos resultados, se encontró conveniente agrupar a las muestras entre el día 6 y el día 9, obteniendo una sensibilidad promedio del 70% para la determinación de NS1; se considera que esta sensibilidad es suficiente para proponer la realización de la prueba en sueros que se encuentren en este período de tiempo y considerarla con valor diagnóstico, sobre todo en los casos en donde no se cuenta con disponibilidad del equipo para la determinación de IgM.

Entre los días 10 y 13, la sensibilidad promedio fue de un 52.5%, la cual coincide con la reportada por los fabricantes al día 5 de evolución, lo que permite considerarla aún como una alternativa con valor diagnóstico. A partir del día 14 la sensibilidad disminuyó de forma notable bajo las condiciones de nuestro análisis, encontrando un promedio de 11.1% entre los días 14 a 16 y a partir de ese último día ya no fue posible detectar a la proteína, lo que sugiere su completa neutralización por parte de los anticuerpos IgM e IgG presentes en el suero.

Con respecto a la aparición de los anticuerpos de tipo IgM, en la figura 9 se observa que a partir del día 6 ya hay un 100% de detección de IgM la cual permanece durante todo el tiempo del estudio. Los resultados de DO obtenidos permiten hacer un análisis semicuantitativo de las concentraciones de IgM en cada uno de los sueros analizados así, para el día 1 solo una muestra fue positiva para la detección de anticuerpos IgM, con una DO de 0.229 que se considera apenas por encima del límite inferior de positividad (0.2), lo que podría corresponder a una concentración baja de anticuerpos; como se puede observar, la DO se va incrementando conforme se analiza en diferentes días encontrando que para el día 6 (inicio de la fase convaleciente de la enfermedad) se obtuvo una DO promedio de 2.252 lo que coincidiría con una mayor concentración de anticuerpos. El pico máximo de DO promedio (2.548) se alcanza entre los días 10 y 13 que corresponden con el periodo en que disminuye significativamente la sensibilidad para detectar NS1. Si se considera que para estos días de evolución ya hay producción importante de IgG (Acosta y Gómez, 2005), la neutralización de la proteína NS1 es elevada y por lo tanto el equipo ya no puede detectar su presencia en suero.

A partir del lanzamiento de los equipos comerciales para detección de NS1, se han realizado algunos estudios, los cuales presentan una variabilidad respecto a las sensibilidades reportadas y generalmente se realizan dentro de la fase aguda sin identificar los límites de detección. En el caso particular del equipo Platelia para NS1, los resultados son variables y en algunos de ellos se reporta una sensibilidad arriba del 93% (Kumarasamy y col. 2007), en tanto que otros reportan una sensibilidad de 73.6% (McBride WJ, 2009).

En un estudio realizado en población francesa (Dussart y col, 2008), se evaluó un equipo comercial para detectar NS1 basado en inmunocromatografía y, simultáneamente, se evaluaron los equipos comerciales de las marcas Bio-rad y Panbio, sin embargo, nuevamente en este estudio solo se realizó la evaluación en la fase aguda de la infección (día 1 a 5). Los resultados obtenidos para el equipo

Platelia en 222 sueros analizados señalaron un 87.4% de sensibilidad (con un intervalo de confianza del 82.3 al 91.5%) y una especificidad del 100%. Los resultados obtenidos en nuestro estudio para este mismo período indican una sensibilidad de 94%, por lo que se hace evidente que probablemente hay grandes variaciones en cuanto al tipo de población en la que se está aplicando el diagnóstico con este equipo. Cabe señalar que el valor de especificidad obtenido en este estudio es de 92.22% pero es solo un cálculo matemático ya que en realidad no aplicamos el ensayo en muestras de pacientes infectados con otro tipo de flavivirus diferentes al virus del dengue.

Existe un estudio en la población de Guangdong, China, donde se hizo un seguimiento de la presencia de NS1 entre los días 1 al 25 (Xu y col, 2006) donde la evaluación no se llevó a cabo con un equipo comercial sino con una técnica desarrollada por los autores con placas sensibilizadas con AcMo anti-NS1 obtenidos a partir del virus DEN-1, lo que limita el estudio a la evaluación de casos. En este estudio se reportó una sensibilidad del 52.8 % para los días 1y 2, en los días 3 al 5 se incrementó la sensibilidad a 68.1%, en tanto que para los días 6 al 10 la sensibilidad aumentó a 83.8%, sin embargo para los días 11 al 15 la sensibilidad bajo de manera notable a 50%, encontrando un 20% para los días 16 al 20 y finalmente, se perdió la capacidad de detección del equipo a partir del día 21 hasta el 25. Se puede observar que aunque este estudio es similar respecto al intervalo de días que se estableció para la detección de la proteína viral, la sensibilidad obtenida con esta técnica en la fase aguda fue de 60.45%, la cual difiere considerablemente del 95% encontrado en este trabajo. Para la fase convaleciente se reportó una sensibilidad de 38.45% la cual coincide con el 33.4% encontrado bajo las condiciones de nuestro laboratorio.

La importancia diagnóstica de la determinación de NS1 surgió a partir de los estudios realizados por Alcon y col. en el año 2002, quienes desarrollaron un sistema inmunoenzimático que les permitió identificar el antígeno circulante en casos de infección primaria desde el primer día de iniciados los síntomas hasta el

día 9, con una concentración de 0.004 a 2 g/mL en muestras de fase aguda (hasta el día 7) disminuyendo a una concentración promedio de 0.04 g/mL a partir del día 8. En infecciones secundarias los niveles de NS1 se encontraron entre 0.01 y 2 g/mL en fase aguda y no se detectaron en ninguno de los casos evaluados en fase convaleciente. Pei y col. (2003) encontraron datos similares en sueros de fase aguda tanto de infección primaria como secundaria. Tomando en cuenta estos estudios se sugiere que la proteína NS1 puede ser detectable durante los días 1 al 8 de la infección, en este trabajo se identificó que para el día 9 aún se tiene un 80% de sensibilidad para identificar NS1 y que el equipo fue capaz de detectar un caso al día 15 y uno al día 16.

Llama la atención que al día 6 post sintomatología sólo se detectó a la NS1 en 6 de los 10 sueros evaluados, en tanto que a los días 5 y 7 fueron 8 de 10 sueros, cada uno, aunque no se demostró, se puede sugerir que esta disminución en la capacidad de detección se puede deber a que la formación de los complejos inmunes para neutralizar al antígeno inicia en el día 6 y coincide con el momento en el que se detecta ya un 100% de sueros positivos a la presencia de anticuerpos neutralizantes de tipo IgM. Se observó que durante la fase aguda de la enfermedad (1 a 5 días después de presentarse la sintomatología) la detección de los anticuerpos IgM específicos contra el virus fue del 28% comparado con 94% de detección para la proteína NS1 del dengue. De forma contraria durante la fase convaleciente (6 a 26 días después de la presencia de sintomatología), se observó 30.58% de detección para la proteína viral y 100% para los anticuerpos IgM.

Tomando en cuenta todos estos datos, la utilización del equipo Platelia en muestras colectadas durante el inicio de los síntomas (día 1 a 5) puede ser de gran utilidad para acelerar el diagnóstico de dengue, en tanto que el uso combinado de ambas técnicas a partir del día 6 y hasta el día 9 incrementa considerablemente la sensibilidad del diagnóstico en fase convaleciente. Estos resultados son importantes ya que corresponden a una muestra representativa de casos en población mexicana, en particular de Veracruz, que ha sido

históricamente el Estado con más casos reportados. La inclusión de la determinación de NS1 por esta técnica como primera opción para el diagnóstico de los casos que se presentan en México, representa un método rápido, sensible y confiable que puede tener un alto valor en la limitación de una epidemia.

10. Conclusiones

1. Se determinó la presencia de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue en sueros de pacientes en fase aguda y convaleciente de la enfermedad mediante un ELISA comercial, estableciendo como tiempo límite de su detección el día 9 después de iniciados los síntomas con un elevado valor de sensibilidad.
2. Se estableció la correlación inversa entre la aparición de los anticuerpos específicos IgM contra el virus del dengue y la detección de la proteína NS1 en sueros de pacientes infectados.
3. Se estableció que la proteína NS1 puede ser identificada en muestras almacenadas a 4°C por periodos prolongados (mayores a un año), no siendo así para la detección de partículas virales infectivas.

11. Referencias

Acosta BC y Gómez CI. 2005. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica*; 16: 126-127.

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V y Flamand M. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute Phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*; 40: 376–381.

Anderson R, Wang S, Osiowy C y Issekutz AC. 1997. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*; 71: 4226-4232.

Bielefeldt OH. 1997. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Tren Microbiol*; 5: 409-413.

Boonrat T, Burgess T, Granelli PA, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller M, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman R, Schlesinger S y Marovich M. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*; 197: 824.

Brant WE, McCown JM, Gentry MK y Russell PK. 1982. Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to flavivirus cross-reactive determinants. *Inf Immun*; 36: 1036-1041.

Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes M, Rodrigues M, Storck-Herrmann S, Cesaire S, Morvan J, Flamand M y Baril L. 2006. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vacc Immunol*; 13:1185–1189.

Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A y Moua D. 2008. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis*; 2: 1-2.

Falconar A. 2007. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis and vaccine design. *Clin Vac Immunol*; 14: 495.

Gubler DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol*; 11: 480-496.

Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL y King CC. 1999. Analysis of the steps involved in dengue entry into host cell. *Virology*; 257: 156-167.

Kumarasamy V, Chua S K, Hassana Z, Wahab AHA, Chem YK, Mohamad M y Chua KB. 2007. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Sing Med J*; 48: 669-73.

Kumarasamy V, Wahaba AHA, Chua KB, Hassana Z, Chem YK, Mohamad M y Chua KB. 2007. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol M*;140: 75-79.

Liu WT, Chen CL, Lee SSJ, Chan CC, Lo FI y Ko YC. 1991. Isolation of Dengue virus with a human promonocyte cell line. *Am J Trop Med Hyg*; 44: 494-499.

Ludert J, Mosso C, Ceballos-Olvera I y Del Angel RM. 2008. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *J Virol*; 5: 51-59.

Marianneau P, Cordova A, Edelman L, Doubel V y Desprès P. 1997. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF- κ B which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol*; 71: 3244-3249.

Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT y Jaeck D. 1999. Infection of primary cultures of human kuffer cells by dengue virus: no viral progeny, but cytokine production is evident. *J Virol*; 73: 5201-5206.

McBride WJ. 2009. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 64:31-36.

Monath TP y Heinz FX. 1996. Flavivirus. *Fields Virology*. 3ra ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 961-1034.

Navarro SE, Desprès P y Cedillo Barrón L. 2005. Innate immune responses to dengue virus. *Med Res*; 36: 426-427.

Pei YS; Li Kuang Ch, Shu Fen C, Yi Yun Y, Ling C, Li Jung C, Chuan C, Ting Hsiang L y JyhHsiung H. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clini Diag Lab Immunol*; 10: 622–630.

Reiter P. 2001. Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspectives*; 109: 140.

Rice CM. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*. 3ra ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 931-960.

Rico HR. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. *Virol*; 174: 479-493.

Rodríguez M y Marzal M. 2004. Dengue: una revisión. Memorias del curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Instituto de Biomedicina, Universidad de Caracas, Venezuela. pp 11.

Rothman A y Ennis F. 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*; 257:1-14.

Rothman AL. 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*; 113: 946 – 951.

Shamala DS, Cheng Lan Ew, Basalingappa Mahesawarappa K y Ramaprabha. 2007. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. *J Inf Dev Count*; 1:182-188.

Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanarooj S, Charoensirisuthikul T y Kasisith J. 2008. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Inf Dis*; 197: 1460.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya SS, Rothman A., Ennis FA y Nisalak A. 1997. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect. Dis*; 176: 322–330.

Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY y Che XY. 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol*; 44: 2872–2878.

Young P, Paige A, Bletchly C y Halloran W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*; 38:1053–1057.

URLS:

www.dgepi.salud.gob.mx, consultado el 20 de agosto de 2009.

www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/manuales/Man19-Dengue/Man19.htm consultado el 06 de mayo de 2009.

INSERTOS:

Biorad. (2006). Platelia® dengue NS1 Ag: Qualitative or semi-quantitative detection of dengue virus NS1 antigen in human serum or plasma by enzyme immunoassay p 34-98.

Panbio. (2006). Dengue IgM capture ELISA p 1-7.

Focus Diagnostics. (2006). Dengue fever virus IgM capture Dx Select Equipo p 1-4.