

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
UNAN-LEÓN
Facultad de Ciencias Médicas
Carrera de Bioanálisis Clínico**



Tesis para optar al título de Licenciado en Bioanálisis Clínico

Efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue.

Autores:

**Ana Rosa García Soriano
Fredman Ricardo González Hernández**

**Tutor: Dr. Filemón Bucardo R.
Departamento de Microbiología y Parasitología**

León, 16 de agosto del 2011



AGRADECIMIENTO

De manera muy especial agradecemos a todas las personas que colaboraron en la realización de este estudio:

Dr. Filemón Bucardo, por su valiosa tutoría, dedicación y apoyo científico, por la oportunidad de recurrir a su capacidad, experiencia, por sus valiosas sugerencias, y aportes en la realización de este estudio.

Lic. Patricia Blandón por su colaboración técnica en el procesamiento de las muestras y análisis de las mismas.

Al proyecto Susceptibilidad Dengue dirigido por Dr. Filemón Bucardo R. que nos proporciono los reactivos y materiales para el procesamiento de las muestras.

A nuestros seres queridos; padres, hermanos por ser nuestra motivación, por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.



DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, amparo y fortaleza, cuando más lo necesito, y por hacer palpable su amor a través de cada uno de los que me rodean.

A mi familia quienes han sido pilares fundamentales de mi vida acompañándome en mi caminar, por el apoyo que me han brindado para vencer los obstáculos, en especial a mis padres y hermanos ejemplos de sacrificio, abnegación y altruismo.

A mi novia Elyin Rugama por ese optimismo que siempre me impulso a salir adelante, por su amor, su comprensión y dedicación sin límites.

Fredman González Hernández



RESUMEN

Efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue.

Br. Ana Rosa García.* Br. Fredman González Hernández.* Dr. Filemón Bucardo R. **

*Estudiantes de Bioanálisis Clínico. Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-LEÓN.

**Profesor del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNAN-LEÓN.

En todo el mundo se estima que el número de afectados por Dengue se encuentra entre los 50 a los 100 millones de personas cada año, con un total de 500,000 hospitalizaciones y 12,500 muertes. El diagnóstico de la enfermedad es complejo y requiere el empleo de técnicas especializadas, las cuales no están disponibles donde más se requieren. El método de diagnóstico ideal sería, de fácil ejecución, bajo costo, rápido y que brinde resultados confiables. A fin de evaluar el efecto de anticuerpos IgG sobre el antígeno NS1 del virus dengue se estudiaron 77 casos de pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue, en el periodo octubre del 2008 - abril del 2009, atendidos en el HEODRA. Los casos fueron analizados utilizando las pruebas diagnósticas Bio-Rad (Platelia- Dengue NS1 Antígeno) y Panbio ELISA Indirecto IgG. Del total de casos analizados el 12% fueron positivos para NS1, y el 30% fueron IgG positivos. Se obtuvieron 4 muestras positivas por ambos métodos diagnósticos. Se encontró una excelente relación entre los casos NS1-positivos y el cuadro clínico de la infección. La mayoría de los casos NS1-positivos corresponden al sexo femenino y se encontraba entre el grupo de edad de 6 -15 años. El 78% de los casos NS1-positivos se observaron en los primeros 3 días de iniciados los síntomas, confirmando de esta manera la utilidad de la prueba en el diagnóstico temprano de la enfermedad. El análisis de concordancia ($\kappa = 0.09$) revela que la presencia de los anticuerpos IgG anti-dengue no afecta la positividad de la prueba de NS1.



Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	3
III.	Justificación.....	5
IV.	Planteamiento del problema.....	6
V.	Objetivos.....	7
VI.	Marco teórico.....	8
	VI.1 Clasificación y estructura del Virus Dengue.....	8
	VI.2 Perfil Epidemiológico de la enfermedad.....	10
	VI.3 Perfil Clínico y clasificación del Dengue.....	12
	VI.4 Patogénesis e Inmunología.....	17
	VI.5 Ciclo de Replicación Viral.....	20
	VI.6 Marcadores Moleculares para el diagnóstico del Dengue.....	22
VII.	Diseño metodológico.....	25
VIII.	Resultados.....	34
IX.	Discusión de resultados.....	38
X.	Conclusiones.....	42
XI.	Recomendaciones.....	43
XII.	Bibliografía.....	44
XIII.	Anexos.....	47



I. Introducción

El dengue es un problema de salud pública importante a nivel mundial. Es una enfermedad que se ha mantenido constante los últimos años en nuestro país, cuya incidencia ha aumentado rápidamente durante las últimas décadas, implicando internación, cuidados intensivos y posibilidad de muerte, en pacientes susceptibles. Estas condiciones suelen alterar los sistemas de salud y a toda la sociedad debido a los altos costos que representan los pacientes hospitalizados. ⁽¹⁾

El diagnóstico temprano y preciso del laboratorio es esencial para la confirmación del dengue. En la actualidad los métodos de diagnóstico se basan en técnicas directas e indirectas, que van desde el aislamiento e identificación del virus, hasta la identificación de anticuerpos. Los dos primeros ensayos proporcionan alta sensibilidad durante la fase aguda de la enfermedad; sin embargo los resultados tardan y muchos laboratorios no poseen dichas técnicas por el alto costo. Dentro de las pruebas serológicas se encuentran la detección de anticuerpos IgM e IgG, los cuales siguen siendo los más utilizados para el diagnóstico de dengue. Pero estos solo establecen un diagnóstico probable pudiéndose presentar falsos positivos y falsos negativos en sueros de fase aguda con títulos bajos de anticuerpos. Además estos resultados se obtienen después que la enfermedad ha finalizado. ^(1, 2)

La determinación de anticuerpos IgM en fase aguda posee diferentes niveles de especificidad, es un método rápido y sencillo. Sin embargo la respuesta de estos anticuerpos varía considerablemente debido a la respuesta inmunitaria humoral en función si la infección es primaria o secundaria. La IgG al igual que la IgM es un método que no presenta grandes complicaciones no obstante la detección de esta solo tiene significado epidemiológico. ⁽²⁾



Recientemente, se han desarrollado nuevas pruebas para ayudar a diagnosticar a pacientes con dengue, actualmente se perfila como un método de diagnóstico la identificación de la proteína no estructural NS1 del virus del dengue, que es una glicoproteína que pesa aproximadamente 48-KDa la cual está ausente en las partículas virales, pero se acumula en la membrana plasmática de la célula durante la infección y aparece en sangre durante los primeros días de infección. (3, 4)

La determinación del antígeno NS1 ha demostrado ser una herramienta útil, por las propiedades antigénicas e inmunogénicas de esta proteína y su posible relación con manifestaciones hemorrágicas. Este ensayo tiene ventajas sobre los métodos moleculares y cultivos por ser más rápido, de fácil ejecución, estandarización, comodidad y rentabilidad. La función de la NS1 en la patogénesis viral no ha sido bien dilucidada, pero se ha planteado que posee un papel en la replicación temprana del virus. Las mutaciones de esta proteína afecta la virulencia de la partícula viral. (5, 6,7)

En el presente trabajo de investigación se revisa el estado actual del conocimiento de las características generales del virus del dengue, se estudia la proteína NS1, su papel en la respuesta inmunológica y su empleo como una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad. Así mismo se evalúa la respuesta y el efecto de anticuerpos IgG sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue, lo que ayudará a aclarar el valor combinado de estas pruebas; sugiriendo una modificación al algoritmo de diagnóstico del laboratorio del dengue.



II. Antecedente

Actualmente existen diversas publicaciones científicas con relación a la proteína no estructural NS1 del virus del dengue, las cuales en su mayoría están dirigidas a la comparación de técnicas diagnósticas capaces de mostrar alta sensibilidad y especificidad en la identificación antigénica de la proteína de manera que los resultados mostrados sean confiables para el diagnóstico de la enfermedad.

Dongmei Hu, y col, con el objetivo de evaluar el valor combinado de diagnóstico de NS1, IgM e IgG, estudiaron los perfiles cinéticos de estas pruebas en el curso de la enfermedad por dengue; analizando 313 muestras de suero pareadas o múltiples de 140 pacientes que fueron confirmados por el laboratorio con infección aguda por DENV1, estos investigadores utilizaron las pruebas ELISA NS1- DENV1 específica no comercialmente disponible, Panbio Dengue IgM e IgG ELISA, determinándose una sensibilidad global de detección de 89% para NS1 en muestras tomadas durante los primeros 7 días. En contraste, anti-dengue IgM e IgG, no se detectaron antes del día 3 de enfermedad. Combinando los resultados de NS1 y la detección de IgM permitió el diagnóstico positivo del 96,9% de los casos. Demostrando que la combinación de estas pruebas IgM y NS1 facilita una mayor tasa de diagnóstico en la fase aguda de la infección. La tasa de positivos de IgG fue significativamente menor que de IgM en la primera semana, aumentando a 100% a los 15 días de la enfermedad. ⁽³⁾

Vu Ty Hang y colaboradores publicaron un estudio cuyo objetivo era conocer la especificidad, sensibilidad, respuesta de anticuerpos anti-dengue y la relación con el grado de viremia de la proteína no estructural NS1 en el diagnóstico de la infección por el virus del dengue utilizando el kits Bio-Rad (Platelia- Dengue NS1 Antígeno); sus hallazgos sugieren que es más sensible su determinación cuando se utiliza durante los 3 primeros días de la enfermedad. Estos resultados también muestran que la concentración de proteína no estructural NS1 es un reflejo de la cantidad de virus en la sangre cuya importancia está vinculada con la gravedad de la enfermedad. Estos investigadores estudiaron 138 casos hospitalizados con



sospecha de dengue de los cuales 125 pacientes se clasificaron dentro de la categoría de pacientes con dengue grave, hubo 13 pacientes en los que no había pruebas de infección aguda o reciente por el virus del dengue. La sensibilidad para NS1 en relación a IgG es 60.5% y 93.1% en casos positivos y negativos respectivamente. En relación a la especificidad de NS1 y anticuerpos IgM se observó 71.4% y 87.7% en casos positivos y negativos respectivamente. ⁽⁸⁾

Shrivastava. A y colaboradores con el objetivo de demostrar el potencial confirmatorio de la proteína NS1 en infecciones primarias por dengue en comparación con otros métodos del laboratorio; analizaron 91 sueros del Hospital Militar de la India, obtenidos en el 2008, utilizando un antígeno NS1 de captura (Panbio, Australia), disponibles comercialmente para la detección temprana del virus del dengue. Sus resultados muestran 24 sueros positivos con el kit NS1, también evaluaron la presencia de anticuerpos: obteniendo seis IgM, siete IgG y cinco ambos (IgM e IgG). Observaron que las muestras positivas para IgM también lo eran para NS1, en cambio ninguna muestra positiva para IgG lo fue para NS1. ⁽⁹⁾

Barrero Rafael y col, en 2007 con el propósito de lograr un avance en el diagnóstico de la enfermedad por dengue evaluó la utilidad diagnóstica de la proteína NS1 como un posible marcador temprano de infección por el virus dengue, utilizando el estuche de Bio-Rad (Platelia Dengue NS1 Antígeno). Se estudiaron 210 muestras de sueros de 71 pacientes procedentes del Hospital Salvador Allende de Cuba, todos confirmados como casos positivos para dengue; se incluyeron 150 muestras negativas como controles; los resultados muestran una sensibilidad del 90.15% y una especificidad del 100% para Platelia NS1. De los 71 pacientes, 12 fueron clasificados como primarios, 55 como secundarios y 4 indeterminados; concluyendo que la cinética de la proteína NS1 permite detectar los casos entre el segundo y cuarto día de infección, útil en el manejo de los pacientes y el control de la enfermedad. ⁽¹⁰⁾



III. Justificación

Comprender el efecto de la presencia de anticuerpos IgG durante la infección por dengue sobre la detección de NS1 nos ayudará a identificar ventajas y desventajas de estas pruebas, lo que permitirá su utilización conjunta en la implementación de un nuevo algoritmo de diagnóstico de la enfermedad por dengue.



IV. Planteamiento del problema

¿Cuál es el efecto de la presencia de anticuerpos IgG sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue?



V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la presencia de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue utilizada en el diagnóstico de pacientes hospitalizados.

5.2 Objetivos Específicos

1. Describir el perfil clínico y epidemiológico de la población en estudio y su relación con la presencia de la proteína NS1 y anticuerpos IgG anti-dengue.
2. Evaluar el estado inmunológico mediante la determinación de anticuerpos IgG anti-dengue de los pacientes con diagnóstico clínico de dengue.
3. Detectar la proteína no estructural NS1 del virus del dengue en pacientes con diagnóstico clínico de dengue.
4. Correlacionar la presencia de la proteína NS1 y la presencia de anticuerpos IgG de las personas en estudio.



VI. Marco teórico

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se trasmite al hombre a través de un mosquito del género *Aedes*, presentando un amplio espectro de formas clínicas que van desde la fiebre indiferenciada hasta las formas más graves con hemorragia y choque. La importancia del virus dengue está determinada por las manifestaciones hemorrágicas que pueden llevar al paciente a la muerte. ^(6,11, 12)

6.1 Clasificación y estructura del virus Dengue

El virus dengue pertenece a la familia Flaviviridae y al género Flavivirus, está integrado por 4 serotipos conocidos con el nombre de DEN-1 DEN-2 DEN-3 DEN-4; los cuales comparten determinantes antigénicos comunes formando un grupo filogenético estrechamente relacionado; aunque presentan diferencias en la secuencia de nucleótidos aproximadamente 25-34%. De los cuatro serotipos DEN-4 parece ser el más divergente. El genoma del virus dengue está constituido por una simple cadena de ARN de sentido positivo y peso molecular de 4,2 kD, que codifica para una glicoproteína de la cual se derivan las demás estructuras virales. ^(6, 11, 12, 13, 14)

Los viriones maduros son partículas esféricas de 40-70 nm de diámetro, que contienen un núcleo electrodensito de 30 nm de diámetro rodeado por una bicapa lipídica, la cual se deriva de la membrana celular del hospedero. El genoma se ensambla en una cápside icosaédrica compuesta de la proteína de cápside viral (C), que es una pequeña proteína básica en forma de dímero. La glicoproteína de la envoltura (E) está dispuesta en trímeros que forman la superficie del virión inmaduro que luego cambia por acción de reguladores hacia la maduración viral; la proteína pre-M se convierte en M, dando a la superficie del virión maduro una apariencia lisa. ^(12,13)



El genoma es de aproximadamente 11 kb de longitud y está flanqueada por regiones conservadas sin traducir (NTR) que forman estructuras secundarias que median la circularización del genoma y tienen funciones importantes en la replicación, estas regiones no transcritas (5'NTR y 3'NTR), son responsables de la estructura del ARN; y codifican una proteína "precursora" que, luego de ser seccionada por enzimas, da origen a tres proteínas estructurales del virus nucleocápside (C); proteína asociada a la membrana (M); una proteína de envoltura (E) y a 7 proteínas no estructurales (NS). Las tres proteínas estructurales C, M y E están localizadas en el extremo aminoterminal, mientras que las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 están en el extremo carboxilo de la poliproteína. Los dominios proteicos responsables de la neutralización, fusión e interacciones con el receptor del virus están asociados a la proteína de envoltura E que tiene relación con la biología del virus y la inmunidad humoral. ^(13, 15, 16,17)

Las funciones de todas las proteínas no estructurales no están bien caracterizadas, sin embargo, se ha demostrado que la proteína NS1 interactúa con el sistema inmune del huésped, y que también tiene funciones en la replicación. NS2A y NS2B son proteínas asociadas a membrana. La proteína NS3 tiene función helicasa y proteasa. NS4A se ha asociado con alteraciones de la membrana y NS4B se ha asociado con estructuras de membrana que participan en las replications; y en la NS5 radica la función polimerasa del virus. ^(6, 13)



6.2 Perfil epidemiológico de la enfermedad

El dengue afecta a más de 100 países, fundamentalmente a los localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, es una enfermedad viral transmitida por artrópodos que involucra en su ciclo agentes humanos, mosquitos y aspectos demográficos. Desde el punto de vista epidemiológico, los países de América Latina se encuentran en la misma situación en que estaban hace dos ó tres décadas varios países asiáticos: con epidemias a repetición cada 3-5 años y con un progresivo aumento del número de casos de FHD, particularmente en países de América central. Se estima que anualmente ocurren entre 50-100 millones de infecciones. Esta enfermedad es la causa de 300,000 a 500,000 hospitalizaciones anuales con una tasa de mortalidad del 1-5%. ^(1,12)

En la región de las Américas, el número de países donde esta enfermedad es endémica las cifras se han incrementado, el vector se ha extendido a nuevas áreas y los cuatro serotipos del virus han sido detectados en 19 países en los últimos 20 años con un progresivo aumento del número de casos de dengue hemorrágico particularmente en países de América Central, esta situación se hace cada vez más grave y debido a la falta de una vacuna, las acciones de control del vector son las únicas que permiten incidir sobre la enfermedad. ^(16,18)

La expansión de esta infección en América tropical se atribuye a factores como:

1. El dengue es una enfermedad fundamentalmente urbana y los cambios demográficos (crecimiento poblacional y urbanización no planificada) favorecen el contacto con el vector, el combate de este depende de la mano de obra existente, presentando dificultades operacionales debido a la resistencia del *Aedes aegypti* a los insecticidas, debilitando los planes de controles sistemáticos.



2. La creciente urbanización con aumento de la densidad poblacional en las ciudades, (pobre saneamiento ambiental, inadecuado suministro de agua que implica el almacenamiento doméstico de la misma), genera mayor posibilidad de transmisión del virus.

3. El rápido incremento de los viajes aéreos, que posibilita el movimiento de personas en fase virémica y la diseminación de múltiples serotipos y cepas del dengue. Así como el establecimiento de una situación de hiperendemicidad y aumento de la frecuencia de infecciones secuenciales en niños.

4. La producción cada vez mayor de recipientes descartables provee abundantes criaderos potenciales para el vector.



6.3 Perfil Clínico y clasificación del Dengue

Las infecciones virales por dengue varían desde un proceso asintomático a la fiebre indiferenciada o del dengue clásico a la fiebre hemorrágica; el dengue hemorrágico o síndrome de choque por dengue (DH/DCS) son graves y potencialmente mortales complicaciones de la infección por el virus del dengue.

Los factores de riesgo que determinan la probabilidad de enfermar o morir por dengue están relacionadas con el huésped: características genéticas, estado inmunitario, forma de vida y condiciones de salud, saneamiento básico de la vivienda y abastecimiento de agua potable. Con respecto al virus: variabilidad genética de cepas entre y dentro de los serotipos, diferente capacidad patógena y distribución geográfica. ⁽¹⁶⁾

En los casos más graves, el deterioro clínico se caracteriza por un rápido descenso de la temperatura después de varios días de fiebre alta, trombocitopenia, y fugas vasculares en sitios serosos. El síndrome de fuga vascular resulta en hemoconcentración, en adolescentes y adultos pueden presentar un cuadro clínico caracterizado por fiebre moderada, cefalea más o menos intensa, dolores musculares y articulares, dolor retro-orbital, leucopenia. Un rash cutáneo, náuseas y vómitos. ^(5,15)

La FD se caracteriza por fiebre elevada frecuentemente bifásica, de comienzo abrupto, acompañada de cefalea intensa, mialgia, artralgia, erupción maculopapular y leucopenia. En algunos casos se presentan sangramientos menores como petequias, epistaxis y gingivorragia. Su pronóstico es en general benigno, y su convalecencia puede acompañarse de fatiga prolongada durante varios días sobre todo en los adultos. ⁽⁵⁾

La extravasación de líquidos caracteriza a la FHD/SCD, de comienzo similar a la FD, al cuarto o quinto día de evolución, coincidiendo con la caída de la fiebre, se produce un agravamiento de la enfermedad; puede observarse sangrado y



tendencia al desarrollo de choque según la OMS, al presentar sudoración profusa, pulso rápido y débil, estrechamiento de la presión arterial o hipotensión, y piel fría o sudorosa. La FHD/SCD puede presentarse en cuatro grados de severidad. ⁽⁶⁾

6.3.1 Criterios de diagnóstico clínico de los tipos de dengue:

Fiebre por dengue (FD): Se presenta un cuadro clínico caracterizado por aparición repentina de fiebre, con temperatura mayor de 37 °C, con la presencia de signos y síntomas no específicos, incluyendo dolor frontal de cabeza, dolor retroorbital, articular y muscular, náuseas, vómitos y debilidad, erupción en la piel, molestia a la luz, enrojecimiento de la faringe, conjuntivitis, dolor abdominal leve, náuseas, vómito, diarrea, alteraciones del gusto, prurito generalizado, insomnio, temor, depresión, así como bradicardia relativa y adenopatías.

Dengue hemorrágico (DH): Los síntomas incluyen: hemorragias epiteliales, de mucosas y de órganos internos; petequias, púrpura, equimosis, hematuria, epistaxis, sangrado de encías, sangrado intestinal y gástrico, prueba del torniquete positiva a causa de la micro-hemorragia de los capilares.

Se presenta trombocitopenia menor de 100,000 plaq/mm³, hemoconcentración, leucocitosis leve con aumento de linfocitos, albuminuria leve transitoria, hiponatremia, elevación de las transaminasas AST, ALT, aumento de LDH y CPK. El período de shock dura sólo uno o dos días y la mayoría de pacientes responde rápidamente a una vigilancia estrecha con oxigenoterapia, rehidratación y otras medidas.

Síndrome de Choque por dengue (SCD): Es la forma más grave de dengue, necesariamente requiere tratamiento hospitalario, ya que el sistema circulatorio del paciente se ve muy comprometido, aparecen signos de insuficiencia circulatoria, la piel se torna fría, a menudo hay cianosis, pulso débil y rápido, el paciente puede presentar letargo e inquietud y luego entra en la etapa de choque que se



caracteriza por pulso acelerado y débil, reducción de la presión del pulso (20 mmHg o 2,7 kPa o inferior) o hipotensión marcada con piel fría, húmeda y agitación.

Esta etapa es corta, el paciente puede morir de 12 a 24 h o recuperarse con rapidez después del tratamiento; no corregido este síndrome puede llevar a la acidosis metabólica, hemorragia grave del aparato digestivo o cualquier otro órgano con un pronóstico desfavorable. Puede aparecer también encefalopatía por alteraciones metabólicas y electrolíticas. ^(1, 2,11)

6.3.2 Clasificación de la severidad del dengue hemorrágico:

Grado I: Fiebre acompañada de síntomas generales no específicos; la única manifestación hemorrágica DH es una prueba de torniquete positiva.

Grado II: Hemorragia espontánea, además de las manifestaciones de los pacientes de grado I, generalmente en forma de hemorragia cutánea, de otra localización, o ambas. También corresponde a la forma benigna de la enfermedad.

Grado III: Insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, tensión diferencial disminuida (20 mmHg o menos) o hipotensión con piel fría, húmeda y agitación. Puede ser mortal.

Grado IV: Choque profundo con presión arterial y pulso imperceptibles. Generalmente es mortal. ^(1,11)



6.3.3 Actual clasificación clínica del dengue

La Organización Mundial de la Salud (OMS) durante tres décadas, ha reconocido y recomendado la clasificación del dengue antes descrito. Recientemente se han publicado artículos que cuestionan la utilidad de esta clasificación, por considerarla rígida, demasiado dependiente de los resultados de laboratorio, no inclusiva de enfermos con dengue con otras formas de gravedad, como encefalitis, miocarditis o hepatitis grave, e inútil para el manejo clínico de los enfermos. ⁽¹⁹⁾

Por lo cual la OMS auspició un estudio internacional, llamado DENCO (Dengue Control), cuyo objetivo principal fue encontrar una mejor clasificación de la enfermedad e identificar los signos de alarma útiles para mejorar el manejo de casos de dengue.

Proponiéndose una clasificación binaria de la enfermedad:

- **Dengue** $\left\{ \begin{array}{l} \text{Dengue sin signos de alarma} \\ \text{Dengue con signos de alarma} \end{array} \right.$
- **Dengue grave.**

Los criterios para la clasificación de dengue grave son:

- Extravasación grave de plasma, expresada por la presencia de shock hipovolémico, y/o por dificultad respiratoria debida al exceso de líquidos acumulados en el pulmón.
- Hemorragias severas.
- La afectación de órganos: hepatitis grave por dengue (transaminasas superiores a 1000 unidades), encefalitis o afectación grave de otros órganos, como la miocarditis.



Clasificación del dengue

▪ Dengue sin signos de alarma:

Los casos de dengue sin signos de alarma pueden ser tratados de manera ambulatoria, excepto en el caso de que presenten condiciones coexistentes o de riesgo social que modifiquen el tratamiento como: embarazo, niños menores de 3 meses, adultos mayores (70 años), obesidad, diabetes mellitus, cardiopatías, otras condiciones clínicas (hemoglobinopatías, etc.). Riesgo social: vivir solo, difícil acceso al hospital, pobreza extrema, otros.

▪ Dengue con signos de alarma:

Si uno o más de los siguientes signos de alarma está presente, el paciente con dengue se clasifica como dengue con signos de alarma y es necesario referirlo a un Hospital: dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, derrame seroso (en peritoneo, pleura o pericardio) detectado por clínica, por laboratorio (hipoalbuminemia) o por imágenes (ecografía de abdomen o Rx de tórax), sangrado de mucosas, somnolencia o irritabilidad, hepatomegalia (> 2 cm), laboratorio (si está disponible): incremento brusco del hematocrito concomitante con rápida disminución del recuento de plaquetas.

▪ Dengue grave:

Criterios: Uno o más de los siguientes hallazgos: Shock hipovolémico por fuga de plasma, distres respiratorio por acumulación de líquidos, sangrado grave, daño importante de órganos. ⁽¹⁹⁾



6.4 Patogénesis e inmunología

La infección por cualquiera de los serotipos puede producir diferentes formas clínicas de la enfermedad, desde un cuadro clínico leve hasta la forma severa conocida como FHD que ocasionalmente conduce a la muerte por choque. Aunque la patogénesis del dengue es controversial, actualmente se plantean numerosos factores de riesgo, dentro de los que se incluyen las variaciones que experimentan los virus, factores dependientes del hospedero, como el papel que juega la respuesta inmune innata, incrementada por factores intrínsecos, tanto del virus (genotipo) como del huésped, factores relativos al vector, epidemiológicos y las condiciones ecológicas. ^(12,17)

El primer paso en la infección por dengue requiere la interacción entre la partícula viral y el complejo receptor presente en la superficie de la célula huésped los macrófagos y monocitos son el principal objetivo del virus. La proteína de envoltura del virus (proteína E) juega un importante papel en la fijación del virus a las células diana; contribuyendo en la interacción con los receptores celulares. ^(17, 20)

Una vez dada esta interacción entre los receptores celulares y las partículas virales se desarrolla una respuesta inmunológica en el huésped, la cual depende de la exposición previa o no al virus; en una primera infección por un serotipo específico, queda protegido contra ese serotipo, pero no contra los otros serotipos y, al contrario, en una infección secundaria o terciaria.

Los anticuerpos heterólogos formados, en concentraciones sub-neutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en el virus que ocasiona la infección secundaria y pueden formar inmunocomplejos con el virus y facilitar la entrada de este a las células mononucleares. ⁽¹²⁾



La infección se amplifica ya que los inmuno-complejos infecciosos pueden acceder con más facilidad a los receptores para Fc de los monocitos, donde se multiplicarán en gran cantidad, empobreciendo la membrana celular, lo que ocasiona salida de sustancias vasoactivas como: bradiquina, histamina, sustancias activadoras del complemento, citoquinas y otras, que llevan al aumento de la fragilidad capilar lo que ocasiona salida del plasma del espacio intravascular al extravascular, produciéndose los derrames pleurales, abdominales, articulares y en cualquier otro espacio del organismo. ⁽¹⁾

Esto lleva a la depleción del volumen sanguíneo y como consecuencia, se desarrolla el SCD. También se activan las sustancias que estimulan la aparición de la coagulación intravascular diseminada (CID) lo que agrava el síndrome de choque. ⁽¹⁾

Anticuerpos similares son producidos por la proteína no estructural NS1 quien interactúa con factores de la coagulación y células endoteliales. El mecanismo por el cual la proteína no estructural NS1 contribuye a la patogenia del virus sigue siendo incierto sin embargo, un elemento esencial de genes dentro de las células infectadas funciona como un cofactor para la replicación del RNA viral, NS1 se sintetiza en una célula infectada como un monómero soluble y rápidamente después de dimerizarse en el lumen del retículo endoplasmático, se acumula en la célula en grandes cantidades y es liberada al medio extracelular. ⁽⁵⁾

Es posible que el DH se acompañe de reacciones autoinmunitarias. Esto puede deberse a la presencia de anticuerpos contra la proteína viral E y contra la proteína viral NS1 (con reactividad cruzada con algunos factores de la coagulación y con las plaquetas, respectivamente). Estos anticuerpos pueden desempeñar un papel importante en el mecanismo patogénico durante la infección secundaria; se ha planteado que existe interacción entre el sistema del complemento y la proteína NS1. ⁽²⁰⁾



El mecanismo del sistema del complemento en la patogénesis del dengue no ha sido bien caracterizado, sin embargo, se considera que juegan un papel importante ya que la activación del complemento C3a y C5a se asocia con pérdida de plasma. Además, se plantea que la reducción de los componentes del complemento es un factor inhibitor de la proteína soluble NS1, y provoca un aumento de anticuerpos contra la proteína NS1. ⁽¹³⁾

6.4.1 Inmunología de la proteína NS1

La proteína no estructural NS1 se relaciona con la respuesta inmune específica de serotipo ya que la célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, resultando interesante su uso potencial en la protección del hombre contra la infección por Flavivirus. La proteína NS1 porta 2 ó 3 sitios de glicosilación en las especies virales, induce una inmunidad protectora y además, aporta epítomos específicos de grupo y de tipo. Se tiene el consenso que la NS1 induce inmunidad y que la inmunogenicidad es verdaderamente dependiente de la estructura conformacional de la molécula. La forma dimérica es más antigénica que la forma monomérica, pero se ha observado que es destruida por el calor. Los anticuerpos inducidos por esta proteína son esencialmente líticos en presencia del complemento y dan la posibilidad de retardar la infección viral en los tejidos. ^(1,2)



6.5 Ciclo de replicación viral

Actualmente los receptores de la célula huésped y los posibles co-receptores del virus del dengue no están bien caracterizados se plantean como potenciales receptores: células dendríticas de la epidermis, manosa, monocitos y macrófagos. El virus del dengue se une al receptor celular a través de la proteína E; luego el virus penetra mediante endocitosis. Después de la internalización el pH baja, provocando un cambio conformacional en la proteína E, que revela un péptido de fusión entre el virión y las membrana endosomal. ^(12, 13)

A continuación la cápside es liberada de la envoltura viral en la célula, disociándose y liberando el genoma viral, la traducción primaria del ARN mensajero da como resultado una poliproteína que luego de varios clivajes y procesos post-trasduccionales da lugar al virión y los componentes replicativos.

La replicación del ARN comienza con la síntesis de una cadena negativa complementaria que es empleada como molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN positivo que pueden ser usadas para la traducción de nuevas poliproteínas, síntesis de cadenas negativas o pueden ser encapsidadas para la formación de nuevos viriones. El ARN de los virus del dengue contiene un marco abierto de lectura para una polimerasa que esta insertada dentro de la membrana del retículo endoplasmático.

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente; conduciendo a la formación de las distintas proteínas virales: tres proteínas estructurales; cápside C, un precursor de la proteína pre-M de membrana y la proteína E de envoltura, y siete proteínas no estructurales que tienen funciones de mediación en la replicación, procesamiento y ensamblaje del virión.



Los viriones inmaduros son llevados en vesículas de transporte que salen de la membrana del retículo endoplasmático y por un mecanismo específico son transportadas al pre-Golgi pasando posteriormente al aparato de Golgi.

En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular. La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica con la membrana plasmática o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior.



6.6 Marcadores Moleculares para el diagnóstico del Dengue

El diagnóstico integral del Dengue se hace sobre la base del cuadro clínico, factores epidemiológicos y por diversos métodos de laboratorio, basados fundamentalmente en el aislamiento viral y en técnicas serológicas; cada uno de ellos con distintos grados de sensibilidad, especificidad y complejidad. ⁽¹⁵⁾

El diagnóstico viral incluye técnicas directas que demuestren la presencia viral y técnicas indirectas capaces de exponer la respuesta del organismo producto de la infección; las primeras visualizan la partícula viral o su efecto celular específico: como las tinciones para microscopía de luz, la microscopía electrónica y el cultivo o aislamiento viral. En relación a los métodos indirectos son las técnicas serológicas tradicionales para descubrir anticuerpos contra determinado agente viral, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos. ⁽¹⁵⁾

6.6.1 Detección del genoma viral:

La detección de genoma viral permite un diagnóstico específico durante la etapa temprana de la enfermedad que varía de 2 a 10 días. Un resultado positivo permite el diagnóstico, sin embargo, un resultado negativo no excluye la posibilidad de dengue. El momento de la toma de muestras es fundamental para la detección de ARN, sin embargo, el manejo y almacenamiento de la muestra también son importantes para mantener el ARN viral; ya que es vulnerable a la contaminación, y requiere de instalaciones específicas de laboratorio y equipos. A diferencia de los métodos serológicos la detección del ARN permite la tipificación de los serotipos que causan la infección, lo cual es importante para el seguimiento epidemiológico.



La detección del ARN se logra a través de la reacción en cadena de polimerasa - transcripción reversa (RT-PCR); que es un método “*in vitro*” que utiliza la síntesis enzimática para replicar selectiva de una región diana del ARN, logrando su amplificación y proporcionando una copia de ADN complementario (cDNA). En principio, el ARN viral se extrae de la muestra de suero, que se transcribe a ADN en una reacción de transcripción inversa. Dependiendo del propósito de amplificación se logra obtener regiones conservadas del genoma, como la NS3 y 3'UTR, o áreas específicas muy variables, como la C- pre M y regiones del gen E.

6.6.2 Detección de anticuerpos anti-DENV

Los métodos tradicionales de diagnóstico se basan en la detección de anticuerpos contra el virus del dengue en el suero del paciente; las desventajas de este método son su baja sensibilidad, pues requiere de títulos muy altos para obtener una correcta identificación y que no reaccionen serológicamente con cepas del género flavivirus ya que comparten similitudes estructurales en sus proteínas de la envoltura.

Los ensayos ELISA para el diagnóstico incluyen los típicos ensayos de captura en fase sólida para la detección de anticuerpos IgM e IgG y la detección de anticuerpos IgE e IgA en suero, plasma o saliva. El serodiagnóstico confiable se basa en muestras pareadas con un aumento en los títulos de anticuerpos de la fase aguda (<6 días después del inicio) a la fase de convalecencia (6-30 días después del inicio).

Los anticuerpos IgM anti-dengue en respuesta a la infección se desarrollan rápidamente y hacia el 5to día de la enfermedad presentando cantidades detectables. En general, estos anticuerpos IgM declinan sus niveles entre los 30-90 días del comienzo de los síntomas. Durante una infección secundaria pueden no presentar niveles de anticuerpos IgM. La concentración, especificidad y duración depende en gran medida del individuo.



En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas; permaneciendo elevados durante varias semanas y luego van declinando. Esta elevación significativa permite el diagnóstico presuntivo de una infección secundaria en sueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad. ⁽¹⁴⁾

6.6.3 Detección del antígeno:

Un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue es la detección directa del antígeno viral en el suero del paciente; al ocurrir la viremia en la etapa temprana del período febril, aumentan los niveles de antígenos y por consiguiente, la probabilidad de obtener resultados positivos en muestras tomadas en el primer día de la aparición de los síntomas.

- **Detección de la proteína NS1:**

Los datos actuales sobre la prueba de antígeno NS1 han demostrado que la determinación de la proteína puede tener diferentes sensibilidades en el diagnóstico de infecciones primarias y secundarias, la circulación de la proteína NS1 en la sangre desde el mismo comienzo de la infección hace pensar que se puede utilizar para el diagnóstico temprano de la infección por el virus. La NS1 además induce la formación de anticuerpos anti-NS1 cuya detección pudiera apoyar y complementar el diagnóstico. Se sospecha que los anticuerpos monoclonales utilizados en la prueba pueden preferir algunos tipos DENV, identificando serotipos lo que aumenta su valor diagnóstico; otros estudios sugieren que la detección de la proteína NS1 en suero de los pacientes pudiera servir como un marcador para medir la viremia. ^(6, 17, 13,14)



VII. Diseño metodológico

Diseño de investigación:

El estudio es de tipo Descriptivo de corte transversal.

Muestra de estudio:

Se analizó un panel de 77 muestras de suero de pacientes febriles con diagnóstico clínico de Dengue, atendidos en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello (HEODRA); estas muestras clínicas son parte del estudio Genómica Poblacional del Dengue que se desarrolla en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-LEÓN, el cual cuenta con la aprobación del comité de ética de la facultad; los pacientes acudieron al servicio de emergencia del hospital con síntomas clínicos compatibles por dengue según las normas de la OMS, en el periodo comprendido octubre del 2008- abril del 2009.

A cada paciente al momento de su ingreso se le llenó una historia clínica documentando: datos personales, características socio-demográficas, signos y síntomas clínicos que presentaban.

Criterios de inclusión:

- ❖ Que tenga fiebre >37 C y cualquier otro síntoma característico del dengue según la OMS.
- ❖ Que la persona acepte participar en el estudio; en caso de niños (menores de 12 años) que el familiar inmediato permita que este participe en el estudio.
- ❖ Que firme el consentimiento informado.



Criterios de exclusión:

- ❖ Niños menores de 6 meses de edad.
- ❖ Que las muestras clínicas no cuenten con un volumen mínimo de 1ml al extraerse.

Método para la recolección de datos:

- **Fuente primaria:** se obtuvo mediante la información brindada por los participantes a través de la entrevista que se les realizó para efectos del presente estudio.
- **Instrumento:** se utilizó un cuestionario elaborado y estructurado que nos permitió conocer aspectos generales, situación demográfica, edad, de la población a estudiar. Así como la hoja de consentimiento informado para la toma de muestras sanguíneas.

Forma de recolección de la muestra: las muestras sanguíneas fueron tomadas a cada participante del estudio previa la firma del consentimiento informado. Se les extrajo 5ml de sangre venosa en tubos al vacío sin anticoagulante en un medio aséptico y antiséptico. En niños se recolectó 3ml de sangre. Las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología del Campus Médico de la UNAN-LEÓN para su debido análisis.



Análisis de la muestra:

🚦 Detección de NS1

Detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero o plasma humano mediante el método inmunoenzimático (ELISA de captura para antígenos NS1) por cada muestra recolectada. La prueba utiliza anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) para su captura y revelación. PLATELIA™ Dengue NS1 AG. 72830.

Procedimiento:

Antes de su uso, dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (+18-30°C).

Utilizar un control negativo (R3), dos controles valor umbral (R4) y un control positivo (R5) en cada serie para validar los resultados del ensayo.

1. Establecer atentamente el plan de distribución y de identificación de las muestras de control y de los pacientes.
2. Sacar el soporte y las barritas (R1) del embalaje protector.
3. Depositar sucesivamente en las cúpulas:
 - 50µl de diluyente (R7)
 - 50µl de muestras (controles o pacientes)
 - 100µl de conjugado diluido (R6+R7)
4. Tapar la superficie completa de la microplaca con una película adhesiva.
5. Incubar la microplaca en baño maría o en una incubadora durante 90 ± 5 minutos a 37 ± 1°C.
6. Preparar la solución de lavado diluida (R2)
7. Lavar la microplaca 6 veces con la solución de lavado (R2). Secar la placa sobre un papel absorbente.



8. Preparar la solución de revelación (R8+R9). Distribuir rápidamente en cada cúpula 160µl de la solución de revelación (R8+R9). Dejar que la reacción se desarrolle durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz.
9. Añadir 100µl de solución de parada (R10) en cada cúpula usándose la misma secuencia y el mismo ritmo de distribución que la solución de revelación.
10. Limpiar cuidadosamente la parte de debajo de las placas. Leer la densidad óptica a 450/620 nm con la ayuda de un lector de placas dentro de los 30 minutos después de la parada de la reacción.
11. Verificar antes de transcribir los resultados de la concordancia entre la lectura y el plan de distribución y de identificación de placas y muestras.

Cálculo del valor umbral:

El valor umbral CO corresponde al valor medio de las densidades ópticas de los duplicados del Control Valor Umbral (R4).

Cálculo de la relación de la muestra:

Los resultados se expresan en forma de relación con la ayuda de la fórmula siguiente, en la que S es la densidad óptica (DO) obtenida para la muestra.

$$\text{Relación Muestra} = S/CO$$

Control de calidad:

Para validación del ensayo, deberán cumplirse los siguientes criterios:

- Valores de densidad óptica: $CO > 0.2$
- Relaciones
 - Relación $R3 < 0.4$ (Relación $R3 = DOR3/CO$)
 - Relación $R5 > 1.5$ (Relación $R5 = DOR5/CO$)



Interpretación de los resultados:

Relación	Resultados	Interpretación
Relación < 0.5	Negativo	La muestra es considerada no reactiva para el antígeno NS1 del virus del dengue.
$0.5 \leq \text{Relación} < 1.0$	Equivoco	La muestra es considerada dudosa para el antígeno NS1 del virus del dengue-
Relación ≥ 1.0	Positivo	La muestra es considerada reactiva para el antígeno NS1 del virus del dengue.

🚦 Detección de anticuerpos IgG.

Detección cualitativa de anticuerpos IgG y serotipos específicos 1, 2, 3 y 4. ELISA Indirecto IgG DENGUE Panbio E-DEN01G.

Procedimiento:

Dejar los reactivos se equilibren a temperatura de trabajo (20 – 25°C) antes de iniciar el ensayo.

1. Determinar el número de requerido de microplacas a utilizar, se requieren 5 microplacas para el control positivo, control negativo y el calibrador por triplicado.
2. Usar tubos para pruebas o microplatos para diluir el control negativo (N), control positivo (P), calibrador (CAL) y las muestras de los pacientes.
 - a) A 10 µl de suero adicionar 1000 µl de diluyente suero. Mezclar.
 - b) A 10 µl de suero adicionar 90 µl de diluyente de suero. Tomar 20 µl del suero diluido y adicionar 180 µl de diluyente de suero. Mezclar.



3. Pipetear 100 μ l de las muestras de pacientes diluidas, controles y calibradores en cada pocillo respectivamente.
4. Cubrir la placa e incubar por 30 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
5. Lavar seis veces con diluyente buffer de lavado.
6. Pipetear 100 μ l HRP conjugado anti-humano IgG y agregarlo a pocillo.
7. Cubrir la placa e incubar por 30 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
8. Lavar seis veces con diluyente buffer de lavado.
9. Pipetear 100 μ l de TMB en cada pocillo.
10. Incubar por 10 minutos a temperatura de trabajo ($20 - 25^{\circ}\text{C}$), luego de este tiempo se desarrollara un color azul.
11. Pipetear 100 μ l de la solución stop a los pocillos en la misma secuencia en que se adiciono el TMB. Mezclar. El color azul cambiara a amarillo.
12. Dentro de los 30 minutos leer la absorvancia a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650nm.

Cálculos:

- 1) Calcular el valor medio de la absorvancia del triplicado del calibrador y multiplicarlo por el factor de calibración. Este es el valor de corte Cut-off.
- 2) El valor Index se calcula dividiendo la absorvancia de la muestra entre el valor de corte.
- 3) Alternativamente puede calcular Unidades Panbio multiplicando el valor Index por 10.

Control de calidad:

Los valores serán aceptados siguiendo las indicaciones.

El control positivo y negativo deben de tener especial monitoreo en caso de falla .El control positivo no debe de extender la precisión de Cut-Off.



Interpretación de resultados:

INDEX	UNIDADES PANBIO	RESULTADO
<0.9	<9	Negativo
0.9 – 1.1	9 – 11	Equivoco
>1.1	>11	Positivo

Resultado	Interpretación
Negativo	No hay evidencia de una pasada infección por dengue. Si se sospecha de infección reciente puede confirmarse con una muestra 7-14 días después.
Equivoco	Muestra sugestiva para re-analizar. Si la muestra permanece equivocada repetir la prueba y alternativamente utilizar otro método alternativo.
Positivo	Presencia detectable de anticuerpos IgG indicando una pasada o reciente infección por dengue.

Consideraciones éticas:

Este estudio es parte del proyecto Susceptibilidad Dengue dirigido por Dr. Filemón Bucardo R y del estudio Genómica Poblacional del Dengue que se desarrolla en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-LEÓN, el cual fue validado y aprobado por el comité de Ética Biomédica de la Facultad de Ciencias Medicas de la UNAN-LEÓN (ver. Anexos). Así mismo presentamos un consentimiento informado a los participantes del estudio, protección de la confidencialidad de la información proporcionada, utilizando los resultados única y exclusivamente con fines investigativos y educativos.



Plan de análisis de los resultados:

La información recolectada se proceso en tablas y gráficos analizados a través del programa estadístico SPSS ver.15. Realizándose tablas de frecuencia y porcentaje, tablas de cruces de variables, índice Kappa, prueba Odds Ratio (OR), utilizando como medida de asociación test Fisher, un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.



Operacionalización de las variables:

Variable	Concepto	Indicador	Escala-Categoría
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento del individuo hasta el momento de la entrevista.	Ficha de recolección de datos.	<ul style="list-style-type: none"> • 0-5 años • 6-15 años • 16-30 años • > de 30 años
Sexo	Condición fenotípica que diferencia al hombre de la mujer.	Ficha de recolección de datos.	<ul style="list-style-type: none"> • Masculino • Femenino
Signos y síntomas clínicos: fiebre, cefalea, mialgia, dolor retroorbital, dolor abdominal, vómito, torniquete, petequias, rash, gingivorragia, melena y hematuria.	Conjunto de características clínicas presentes en los individuos indicativos de enfermedad.	Ficha de recolección de datos.	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Presencia de antígenos NS1.	Antígenos NS1 que forman un inmuno-complejo con anticuerpos monoclonal específico.	Datos del laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Presencia de anticuerpos IgG.	Anticuerpos tipo IgG que reaccionan con antígenos presentes en la prueba.	Datos del laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo



VIII. Resultados

Características epidemiológicas de la población. En el presente estudio se analizaron un total de 77 casos hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue. La edad promedio de la población estudiada fue de 15 años y la edad promedio de los casos dengue positivo fue de 26 años, el mayor número de casos estudiados (n = 42) se presentaron entre las edades de 6-15 años y el menor número (n = 7) correspondió a los mayores de 31 años. En relación a la distribución por sexo predominó el sexo femenino (n = 43) en la población estudiada y el mayor número (n = 6) de caso positivos de dengue se observaron en este sexo. (Tabla 1).

Características clínicas de la población estudiada: Las manifestaciones clínicas fiebre, cefalea, mialgia y dolor retro-orbital se encontraron en $\geq 83.1\%$ de los casos analizados. El 42.9% de los casos estudiados presentaron vómito y dolor abdominal. Un 18.2% de los caso fueron positivos para la prueba de torniquete. Los signos clínicos petequias y rash se presentaron en un 14.3% cada uno, gingivorragia fue observado en un solo paciente (1.3%). (Tabla 2).

En cuanto a la relación entre la determinación de la proteína NS1 y las manifestaciones clínicas de la enfermedad observamos que el 100% de los pacientes positivos para el análisis presentaban fiebre, cefalea y mialgia indicando que existe una excelente relación entre los síntomas de la infección y la capacidad diagnóstica temprana de la prueba (NS1). La determinación de IgG también presenta buena relación con las manifestaciones clínicas antes mencionadas, indicando que esos casos positivos pueden ser casos de infección secundaria de dengue. Algo similar ocurre con el dolor retroorbital y dolor abdominal donde se muestra que existe relación entre la presencia de estos síntomas y su positividad en ambas pruebas diagnósticas. En relación a las manifestaciones hemorrágicas tales como petequias y prueba de torniquete no encontramos coincidencia alguna al relacionar estas características clínicas con presencia de la proteína NS1. (Tabla 2).



TABLA 1: Relación entre la presencia de la proteína NS1 y anticuerpos IgG en diferentes grupos de edades y sexo.

Variable	NS1-positivo (%)	OR (IC, 95%)	Valor de P*	IgG-positivo (%)	OR (IC, 95%)	Valor de P*
Edad						
0-5 años (n=14)	0 (0)	0	0.1984	3 (21.4)	0.6403 (0.1968 - 2.0831)	0.3393
6-15 años (n=42)	5 (12)	0.9941 (0.5340 - 1.8505)	0.6167	7 (16.6)	0.4695 (0.2455 - 0.8980)	0.0056
16-30 años (n=14)	1(7.1)	0.6296 (0.0925 - 4.2857)	0.5273	8 (57)	3.1304 (1.2236 - 8.008)	0.0186
31 a más (n=7)	3(42.8)	5.6666 (1.5050 - 21.334)	0.0311	5 (71.4)	5.8695 (1.2265 - 28.0877)	0.0223
Sexo						
Femenino (n=43)	6 (14)	1.665 (0.3819 - 8.739)	0.3723	14 (32.5)	1.336 (0.4916 - 3.738)	0.3727
Masculino (n=34)	3 (8.8)			9 (26.4)		

*Fisher test

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

Para investigar el riesgo de infección por dengue (NS1) en los diferentes grupos de edades y sexo se calculo el OR (IC, 95%), el riesgo de desarrollar dengue en el grupo ≥ 31 años fue significativamente mayor en comparación con los otros grupos de edades (OR=5.6, $P < 0.05$). El sexo femenino tiene mayor riesgo (OR= 1.665) de enfermarse con dengue en comparación con el sexo masculino. (Tabla 1).



TABLA 2: Frecuencia de las manifestaciones clínicas y su relación con la presencia de la proteína NS1 y los Anticuerpos IgG.

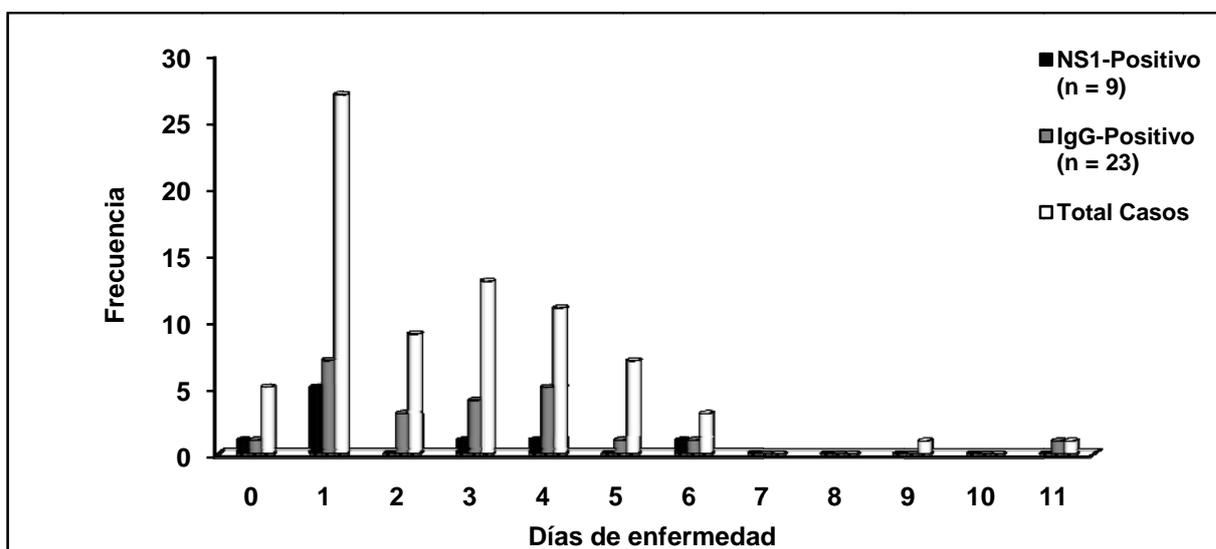
Variable	Frecuencia n=77(%)	NS1-positivo n=9(%)	IgG-positivo n=23(%)
Fiebre	77 (100)	9 (100)	23 (100)
Cefalea	72 (93.5)	9 (100)	20 (86.9)
Mialgia	64 (83.1)	9 (100)	19 (83)
Dolor Retroorbital	64 (83.1)	7 (78)	20 (86.9)
Dolor abdominal	34 (44.2)	4 (44.4)	10 (43.3)
Vómito	33 (42.9)	6 (66.6)	11 (47.8)
Prueba de Torniquete	14 (18.2)	1 (11)	4 (17.3)
Petequias	11 (14.3)	1 (11)	5 (22)
Rash	11 (14.3)	0 (0)	0 (0)
Gingivorragia	1 (1.3)	0 (0)	1 (4.3)
Melenas	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hematuria	0 (0)	0 (0)	0 (0)

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

Relación entre días de infección y positividad de NS1 e IgG: La positividad global para NS1 fue del 11.7%; todas las muestras NS1 positivas (n = 9) se observaron en los primeros 6 días de iniciados los síntomas y el mayor número (n = 6) de NS1 positivo se presentaron entre el cero y primer día. De las 77 muestras investigadas, 23 (30%) fueron IgG positivas, el 87% (n = 20) de estas muestras se encontraron positivas en los primeros 5 días de iniciados los síntomas. (Fig. 1).



Figura 1: Frecuencia de NS1-positivo e IgG-positivo y su relación con los días de enfermedad en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue, durante el periodo octubre 2008 – abril 2009. (n=77).



Correlación de casos positivos para antígeno NS1 y anticuerpos IgG:

Un total de 4 muestras fueron positivas por ambos métodos diagnósticos (NS1 y IgG). Un total de 5 muestras fueron positivas solo para NS1 y 19 solo para IgG. El número de casos negativos por ambos métodos de diagnóstico fue de 49 (63.6 %). (Tabla 3). La concordancia entre NS1 e IgG fue insignificante.

Tabla N°3. Correlación entre la presencia de NS1 y anticuerpos IgG.

Variable	IgG			Kappa Cohen** (IC, 95%)
	Positivo	Negativo	Total	
NS1	Positivo	4 (5.2%)	5 (6.5%)	0.099 (-0.109 – 0.30)
	Negativo	19 (24.7%)	49 (63.6%)	
	Total	23 (29.9%)	54 (70.1%)	

**significado kappa: Insignificante

FUENTE: Resultados del laboratorio.



IX. Discusión de resultados

El presente estudio evalúa el efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1, en 77 pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue.

En relación a los signos y síntomas utilizados para la determinación clínica de casos primarios de dengue seguimos los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud, donde las manifestaciones clínicas características de infección primaria de dengue coincidían con la positividad de la prueba diagnóstica (NS1), demostrando que esta, puede ser utilizada en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Shrivastava y col (2011), demostraron que durante la fase aguda de dengue circulan altos niveles de NS1 permitiendo la captura de dicho antígeno en las primeras etapas de la infección. Dongmei Hu y col (2011) reportaron resultados similares donde demuestran altos niveles de NS1 en muestras de fase aguda de pacientes con infección primaria por Dengue; todos los pacientes de este estudio se clasificaron como fiebre por dengue, ningún paciente tuvo las manifestaciones graves de dengue hemorrágico o síndrome de choque por dengue, según criterios de la OMS.

Un dato interesante de este estudio es que petequias y prueba del torniquete fueron negativas en la mayoría de los NS1-positivos, sugiriendo que la NS1 posee una limitada capacidad diagnóstica de los casos graves de la enfermedad. Cabe destacar que estas características clínicas se presentan comúnmente después del 5^{to} día de iniciados los síntomas, correspondiendo al periodo donde se presentan los casos graves y los niveles de NS1 son bajos.

A diferencia de las observaciones presentadas en este estudio Vu ty hang y col (2009) demuestran que la concentración de NS1 es un reflejo de la cantidad de virus en la sangre cuya importancia se vincula con la gravedad de la enfermedad; según estos investigadores los pacientes con NS1-positivo tiene concentraciones más altas de viriones en comparación a los NS1-negativo lo que pudiera explicar



un cuadro grave posteriormente. Sin embargo, ningún método de diagnóstico es totalmente sensible y específico para diagnosticar todos los casos graves de dengue y por lo tanto se requiere de una batería de pruebas para llegar a un diagnóstico confirmativo de la infección por dengue.

En el presente estudio el 100% de muestras NS1-positivo se obtuvieron en los primeros 6 días de iniciados los síntomas, con una media de 2 días, datos similares fueron reportados por Vu ty hang y col (2009), en pacientes hospitalizados donde muestra que los casos positivos se presentan en los primeros 6 días de infección con una media de 3 días, lo que proporciona un acercamiento a la sensibilidad y especificidad del test en pacientes con una sola muestra clínica. Barrero Rafael (2007), concluye que los mejores días para la detección de la proteína son entre el 2^{do}- 4^{to} día de iniciado los síntomas, donde se logran los mayores valores de OD y porcentajes de positividad para casos secundarios. Shrivastava y col (2011) reporta un 82% de casos NS1-positivos entre el 1^{ro}-9^{no} día después de la aparición de la fiebre en pacientes con sospecha clínica de dengue. Dongmei Hu y col (2011), difieren de los estudios antes mencionados; estos investigadores recolectaron muestras entre los días 1 y 27 después del inicio de los síntomas reportando un 70% de casos positivos entre 8^{vo}-14^{vo} día después de la aparición de la enfermedad; NS1 no fue detectable después del día 14 de aparición de los síntomas.

El porcentaje de casos NS1-positivos determinados en el presente estudio fue de 12%, Shrivastava y col (2011) quienes tiene una población similar (n = 91) reportan 26% NS1-positivos; sin embargo el número de IgG-positivo en el presente estudio fue de 23 (30%), superando el 7 (7.6%) IgG-positivo reportados por estos investigadores.

Según los fabricantes del método utilizado (PLATELIA™ Dengue NS1 AG), la sensibilidad y especificidad promedio es de 91% y 100%, respectivamente para todos los serotipos. Sin embargo, dichas sensibilidades son menores para DenV-2



DenV-1. Vu Ty hang y col (2009) después de evaluar la prueba que utilizamos en este estudio (Platelia- Dengue NS1 Antígeno) determinaron una sensibilidad de 83.5% y una especificidad de 72.5%, además, observaron que la detección de NS1 se reduce significativamente en paciente infectados con DenV-2. Dongmei Hu y col (2011) determinaron una sensibilidad del 89,0% en muestras de DenV-1. Los resultados obtenidos por Barrero Rafael (2007), mostraron una sensibilidad de 91.1% y una especificidad de 100%.

El efecto de la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue no se evaluó en el presente estudio por que dichos anticuerpos aparecen cuando los niveles de NS1 son más bajos. No obstante, futuros estudios deberían considerar esos análisis, puesto que recientes reportes sugieren que la sensibilidad de diagnostico de la enfermedad aumenta al combinar la determinación de NS1 y anticuerpos IgM, demostrado que la sensibilidad de detección de NS1 es significativamente mayor en casos con infección primaria que en casos secundario. Dongmei Hu y col (2011) observaron que al combinar ambos métodos (NS1 y IgM) la sensibilidad incrementa de 58% a 86%. Scott R et, al (2011), evidencian que al combinar NS1 con IgM la sensibilidad incrementa de 69% al 93%.

Al correlacionar los casos positivos para NS1 y anticuerpos IgG se obtuvo un total de 4 casos, lo que sugiere que se tratan de casos secundarios agudos de la infección por dengue; pero lo más importante es que la determinación de la proteína NS1 no se ve afectada con la presencia de anticuerpos IgG. Vu Ty hang y col (2009), obtuvieron un alto número de casos positivos para NS1 y anticuerpos IgG, estos investigadores determinaron 23 muestras positivas para ambos métodos. Todo lo contrario reporta Shrivastava y col (2011) donde ninguna de las muestras positivas-IgG fue encontrado positivo para el antígeno NS1. Dongmei Hu y col (2011) refieren que durante una infección secundaria, la detección del antígeno NS1 en circulación puede ser afectada por los altos títulos de anticuerpos IgG que se suscitaron con anterioridad.



La hipótesis planteada es que la sensibilidad de NS1 puede reducirse en presencia de anticuerpos IgG en el plasma, porque NS1 es secuestrada por complejos inmunes provocando que los epítopes no puedan acceder a los sitios de unión en el ELISA-NS1, según el estudio realizado por Falconar AK y col, demostraron que NS1 induce inmunidad y que la inmunogenicidad es dependiente de la estructura conformacional de la molécula; Fan WF y col; en su estudio muestran que la NS1 se relaciona con la respuesta inmune específica de tipo y serotipo induciendo anticuerpos esencialmente líticos en presencia del complemento.

Investigaciones anteriores demuestran una menor concentración del antígeno NS1 en infecciones por DENV-2, en comparación con otros serotipos debido a una mayor tendencia a la formación de complejos inmunes con IgG pre-existentes o bien a diferencias en la infección viral entre los serotipos.



X. Conclusiones

La mayoría de los pacientes estudiados se encontraban entre el grupo de edad de 6–15 años; predominó el sexo femenino; presentándose en este grupo de edad y sexo el mayor número de casos positivos.

Se observó que los casos NS1-positivos mostraban excelente relación con los síntomas fiebre, cefalea, mialgia y dolor retroorbital las cuales son manifestaciones clínicas de infección primaria por dengue. Sin embargo en cuanto a las características clínicas de dengue hemorrágico no se observó relación.

Se obtuvo un total de 9 (11.7%) casos positivos para NS1 y 23 (30%) para anticuerpos IgG anti-dengue.

Se presentaron 4 casos positivos para ambas pruebas diagnósticas, determinando que la presencia de anticuerpos IgG anti-dengue no interfiere significativamente en la detección de la proteína no estructural NS1 en las muestras analizadas.



XI. Recomendaciones

- Aumentar la población de estudio a fin de que los resultados sean más representativos.
- Incluir muestras recolectadas en los centros de salud provenientes de la comunidad; puesto en este estudio se analizaron solo casos clínicos de pacientes hospitalizados.
- Se recomienda que en las muestras analizadas se utilice una combinación de varias pruebas (anticuerpos IgM, PCR) para complementar el diagnóstico de las infecciones agudas en las diferentes etapas de la enfermedad.
- Conocer el serotipo circulante en las muestras analizadas ya que se ha observado que la prueba ELISA de captura para antígenos NS1 disminuye su sensibilidad frente al serotipo DENV-2.



XII. Bibliografía:

1. Acosta BC, Gómez CI. Biología y métodos diagnósticos del dengue. Revista Biomédica Vol. 16, N° 2 abril- junio, 2005; 16:113-137. Habana, Cuba.
2. Ospina MC. Dengue. Diagnóstico por el laboratorio. Asociación Colombiana de infectología. Revista Infectio Vol. 8-3. Colombia 2004.
3. Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, Wen K, Wang M, Che X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. Virol J. [internet] 2011 Feb; [cited 2011, may 6]; 8:47. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045343/?tool=pubmed>
4. Bessoff, K. Delorey, M. Sun, W. Hunsperger, E. Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnostic of Acute DENV Infection. Vacunas Clin Immunol. Octubre 2008; 15 (10): 1513-1518.
5. Avirutnan P. Zhang, L. Punyadee, N. Diamond, M. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. PLoS Pathog 3(11): e 183. doi: 10.1371/journal.Ppat.0030183.2007.
6. Guzman M, García G, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: a worldwide health problem. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Octubre 2007.
7. Varas YC. Caracterización molecular de la secuencia parcial del Gen de la Glicoproteína NS1 del Virus del Dengue 1 proveniente de Máncora. Revista peruana de medicina en salud pública Lima, Perú. 2000; Vol.17 n. 1-4.
8. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, Van Ngoc T, Hien TT, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3:e360. doi: 10.1371/journal.pntd.0000360.



9. Shrivastava A, PK Dash, NK Tripathi, AK Sahni, N Gopalan, PV Lakshmana Rao. Evaluation of a commercial Dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of dengue infection. Indian J Med Microbiol. [Internet] 2011 Feb; [cited 2011, may 4]; 29:51-5. 2011. Available from <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=02550857;year=2011;volume=29;issue=1;spage=51;epage=55;aulast=Shrivastava>
10. Barrero Rafael. La proteína NS1 como posible marcador temprano para el diagnóstico virológico del dengue. Tesis de la especialidad de Microbiología, Facultad de Biología. La Habana Cuba. 2007.
11. Idiáquez W, Almanza E. Tesis para optar al título de maestro en epidemiología. Características clínicas y epidemiológicas de casos de dengue. Hospital infantil Manuel de Jesús Rivera y Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales 1999-2000. Centro de investigaciones y estudios de la salud pública de Nicaragua. Managua, 2004.
12. Rodríguez Roche Rosmari. "Caracterización Molecular de cepas de Dengue aisladas en epidemias cubanas". Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Tesis en opción del grado de Doctor en Ciencias de la Salud. La Habana, Cuba. 2005.
13. Huhtamo Eili. Dengue Virus Infection. Diagnostics and Molecular Epidemiology. Helsinki University Biomedical Dissertations. N°135, October, 2010.
14. Guzman María, Vasquez Susana. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Revista Cubana de medicina tropical; 54(3); 180-88. 2002.
15. Cubas Antonio, Laurence Rolland. El virus del dengue. Revista Diagnóstico. Volumen 41- número 4. Universidad de Paris- Francia. Julio- Agosto del 2002.



16. JFrancisco, López Antuño, Mota Javier. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. *Revista Panamericana de Salud Pública* vol. 7 n. 5 Washington mayo, 2000.
17. Guzmán M; Pelegrino J; Pumariega T. Control externo de la calidad del diagnóstico serológico del dengue en laboratorios de países de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública* vol. 14 n. 6 Washington, diciembre 2003.
18. Del Ángel RM. Entrada del virus del dengue; Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Revista científica Civestav*. Julio- Septiembre 2006.
19. Enfermedades infecciosas Dengue. Diagnóstico de Dengue. Guía para el equipo de salud, 2da. Edición. ISSN 1852-1819 / ISSN 1852-219X Ministerio de Salud de la Nación Cdad. Autónoma de Bs. As, República Argentina. 2009.
20. Guzmán M. García G. Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. *Revista Panamericana de Salud Pública* 19(3), 2006.



XIII.

ANEXOS



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICA
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

Efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue.

Código laboratorio (Identificador): _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante la firma de este documento, YO, _____ doy mi consentimiento voluntariamente para donar una muestra de sangre y ser entrevistado por los estudiantes investigadores del estudio: **Efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue**, que se desarrollará en el departamento de Microbiología de la UNAN-León. Entiendo que la entrevista está relacionada con la sintomatología clínica, así como, con características epidemiológicas de la enfermedad del dengue.

Entiendo que fui elegido para participar en este estudio, por presentar la sintomatología clínica de la enfermedad del dengue y la donación de una muestra de sangre contribuirá al establecimiento de mejores metodologías de detección de marcadores diagnósticos en la identificación temprana de la infección por este virus, lo que permitirá en el futuro el fortalecimiento de los programas de prevención de las enfermedades causadas por el virus del dengue.

Se me ha informado que los responsables de este estudio no están obligados a cubrir los costos médicos de esta enfermedad y que los resultados de los análisis de laboratorio me serán proporcionados por los estudiantes realizadores del estudio y que puedo solicitar información adicional en el Departamento de Microbiología de la UNAN-León con el Dr. Filemón Bucardo, coordinador de este estudio, Tel: 2311-2947.

He concedido libremente una muestra de sangre y esta entrevista a los estudiantes realizadores de este estudio. Se me ha notificado que es totalmente voluntario y que aún después de iniciado puedo rehusarme a responder cualquier pregunta o decidir dar por terminado en cualquier momento. Se me ha dicho que las respuestas a las preguntas no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificará jamás en forma alguna.

Firma del entrevistado: _____

fecha: _____

Firma del entrevistador: _____

fecha: _____



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS. UNAN-LEÓN**

Efecto de anticuerpos IgG anti-dengue sobre la detección de la proteína no estructural NS1 del virus dengue en pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de Dengue.

Datos Generales:

N° de Ficha: _____

Fecha: __/__/__

Datos personales:

Nombres y apellidos: _____

Edad: ____ Fecha de nacimiento: _____ Sexo: F__ M__

Nombre del padre y/o madre: _____

Dirección: _____

Viajó el último mes: Si__ No__ ¿Dónde? _____

Embarazada: Si__ No__ Tiempo de embarazo: _____

Enfermedad crónica: Si__ No__ ¿cuál? _____

Datos clínicos:

Fecha de inicio de síntomas: __/__/__ Fecha de toma de muestra: __/__/__

Hora de toma de muestra: _____ Hora de refrigeración de muestra: _____

Marque: Si(S) No(N) Desconocido (D)

Síntomas

Signos:

Fiebre__ petequias__ prueba de torniquete positivo__

Cefalea__ melenas__ presión arterial _____mmHg

Mialgia__ hematuria__ Frec. Cardíaca o pulso____/min.

Dolor retroorbital__ gingivorragia__ temperatura ____°C

Dolor abdominal__ rasn _____ vómito _____

Al ingreso en el hospital:

Presencia de signos de deshidratación: llanto sin lágrimas__ mucosa seca__

Globo ocular hendidado__ fontanales hundidas__ pliegue cutáneo__

Hospitalizado__ fecha de ingreso __/__/__

Laboratorio clínico:

Resultados serológicos y virológicos del dengue:

Presencia de la proteína no estructural NS1

Resultado final _____

Presencia de IgG _____



Abreviaturas

ARN	Acido Ribonucleico
cDNADNA complementario
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
DENV	Dengue virus
DF	Fiebre del Dengue
DHF	Fiebre Hemorrágica del Dengue
EIA	Enzimo-Immuno Ensayo
IFA	Inmunofluorecencia
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
KDa	Kilo-Dalton
MAb	Anticuerpo Monoclonal
NS1	Proteína no Estructural 1
NTR	Región no transcrita
OD	Densidad Óptica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRE M	Proteína Pre Membrana
RT	Transcripción Reversa
SCD	Síndrome de Shock por Dengue