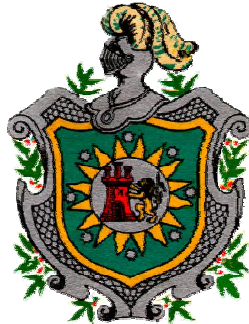


Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León)  
Facultad de Ciencias Médicas  
Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CEI)  
Maestría en Ciencias con Mención en Microbiología Médica



Tesis para optar al título de Master en Ciencias con mención en Microbiología  
Medica.

**Seroprevalencia y Serotipificación del virus del Dengue en el municipio de  
León, Nicaragua durante el periodo de Agosto 2006- Diciembre 2008**

**Autor:**

Licda. Karla Nohemí González Alegría

León, 2009

**Tutor:**

Lic. Orlando Mayorga P. MSc.

Profesor Titular

Dpto. Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Médicas

UNAN-León

**Asesor metodológico:**

Dr. Gregorio Matus Lacayo

Master en Epidemiología y Salud Pública

Profesor Titular

Dpto. Salud Pública

Facultad de Ciencias Médicas

UNAN-León

## *Agradecimientos*

*Considero que ésta es la parte más difícil de la tesis, ya que una gran cantidad de personas aportaron su granito de arena para que este trabajo pudiera culminarse.*

*Debo agradecer de manera muy especial a mi tutor principal el Lic. Orlando Mayorga por ser la cabeza de este trabajo, ya que gracias a sus gestiones se pudo contar con el financiamiento para que este trabajo se llevara a cabo, gracias a las ideas aportadas y al valioso tiempo brindado para las constantes revisiones a lo largo de estos años.*

*Al Dr. Gregorio Matus quien también fue de mucha ayuda aportando sus ideas y conocimientos en la parte epidemiológica, gracias por brindarme parte de su valioso tiempo para revisar el trabajo que se estaba realizando.*

*A Wilton Pérez quien colaboró en la parte metodológica y estadística, gracias por tus valiosos aportes y sugerencias.*

*A las enfermeras Mercedes Salgado y Lupita quienes colaboraron con la recolección de muestras casa a casa en la primera fase del estudio y recolectando las muestras de los centros de Salud en la segunda fase, a todo el personal médico y enfermeras de los centros de salud que colaboraron con la identificación de pacientes sospechosos de Dengue durante el periodo de la segunda fase del estudio.*

*Al lic. Sergio Juárez y personal del SILAIS por la valiosa información brindada que fue de mucha utilidad para el desarrollo del trabajo.*

*A mis compañeros de trabajo y de maestría quienes de una u otra forma dieron su aporte para que este trabajo culminara con éxito. Gracias por estar siempre ahí dispuestos a colaborar.*

*A los participantes del estudio en la primera fase y pacientes de la segunda fase que de manera desinteresada nos dieron su consentimiento para formar parte del estudio y quienes fueron el pilar principal del trabajo.*

*En fin a todas aquellas personas que de una u otra forma me brindaron su tiempo y colaboración en algún momento en el transcurso de este trabajo.*

*A todos Infinitas Gracias y que Dios les bendiga*

*Karla González*

## Resumen

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal el cual se dividió en 2 fases, en la primera fase se recolectaron 813 muestras de la población sana de León entre Agosto del 2006- Febrero 2007 con el objetivo de determinar la prevalencia de Anticuerpos Dengue en la población y describir algunas características epidemiológicas asociadas a la infección por Dengue.

En la segunda fase se incluyeron 132 pacientes que asistieron a consulta médica a los tres centros de Salud de la ciudad (PMN, Mantica, Sutiaba) con sospecha clínica de Dengue entre Junio 2007-Diciembre 2008 con el objetivo de determinar la prevalencia de Anticuerpos IgM e IgG Dengue e identificar los serotipos circulantes, así como describir las características clínicas asociadas a la infección causada por el virus Dengue en estos pacientes.

En la primera fase del estudio se encontró una seroprevalencia a IgG de 93.4% la cual incrementa con la edad desde 65.7% en niños de 2-5 años hasta 97.6% en mayores de 66 años, se encontró 7.9% de infecciones asintomáticas en la misma población sana; el 83.5% presentó infecciones primarias. El 98.5% de las viviendas tenían algún tipo de recipiente para almacenar agua y criaderos de mosquitos, el índice de infestación de viviendas más alto fue de 15.8% y de recipientes 4.5% correspondiente al territorio Mantica que también presentó la mayor seroprevalencia (94.8%)

En la segunda fase se encontró una prevalencia de Anticuerpos IgM Dengue de 48.5% y 75% en niños menores de un año, la prevalencia de IgG fue de 82.6% e incrementaba con la edad desde 25% en menores de un año hasta 100% en mayores de 45 años, el serotipo circulante fue el DENV-2 y la sintomatología clínica mas frecuente encontrada fue: fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y dolor retroorbital, en menor porcentaje algunas manifestaciones hemorrágicas como prueba del torniquete positiva, petequias, epistaxis, ictericia, hepatomegalia y gingivorragia.

Se recomienda hacer énfasis en los programas de prevención y control del dengue y de su vector y promover la asistencia temprana ante la presencia de los signos de alarma a las unidades de salud con el fin de evitar las formas graves de la enfermedad.

## Glosario de términos

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**C:** Cápside

**CIDS:** Centro de Investigación en demografía y salud

**Conglomerado:** Es aquella muestra que se obtiene dividiendo a la población en grupos primero en el marco del muestro y seleccionando después todos los grupos elegidos.

**DENV:** Virus Dengue

**DF:** Fiebre dengue o dengue clásico

**DHF:** Fiebre por Dengue hemorrágico

**DICT50:** Tissue culture infection dose 50

**DS :** Desviación estandar

**DSS:** Síndrome de Shock por Dengue

**E:** Envoltura

**EPIDAT:** Analisis epidemiológico de datos tabulados

**ELISA:** Ensayo inmuno enzimático ligado a enzimas

**Estratos:** Número de elementos que se seleccionan para proceder a seleccionar a partir de ellos los individuos que formaran parte del estudio.

**IC:** Intervalo de confianza

**IF:** Inmunofluorescencia

**IR :** Indice de infestación de recipientes

**IV :** Indice de infestación de viviendas

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IH:** Inhibición de la hemaglutinación

**JEV:** Virus de encefalitis japonesa

**M:** Membrana

**mmHg:** milímetros de mercurio

**NS:** Proteínas no estructurales  
**OMS:** Organización mundial de la salud  
**PAHO:** Organización panamericana de la salud  
**pb:** Pares de bases  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PrM:** Precursor de proteína M  
**PMN:** Perla María Norori  
**PNRP:** Prueba de neutralización por reducción de placas  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RP:** Razón de prevalencia  
**RT:** Transcriptasa reversa  
**SPSS:** Statistical package for the social sciences  
**TBE:** Tris Borato EDTA  
**TBEV:** Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas  
**YFV:** Virus de la fiebre amarilla

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Nº Página</b>
Introducción.....	9
Planteamiento del problema.....	12
Objetivos.....	13
Marco Teórico.....	14
Diseño Metodológico.....	37
Resultados.....	49
Discusión.....	61
Conclusión.....	70
Recomendaciones.....	72
Referencias.....	73
Anexos.....	77



## Introducción

La infección por el virus del Dengue es una de las enfermedades transmitidas por vectores más ampliamente distribuida a nivel mundial. Actualmente se estiman más de 50 a 100 millones de casos de enfermedad febril aguda (DF) cada año, y de estos 500,000 terminan en una forma severa de la enfermedad como Dengue hemorrágico (DHF) y síndrome de shock por Dengue (DSS) <sup>(1)</sup>

Dengue y DHF son causados por un grupo de virus miembros de la familia Flaviviridae y género Flavivirus e incluye 4 serotipos de la especie Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). La infección con uno de estos serotipos no provee inmunidad cruzada y por ende las personas que habitan en áreas endémicas pueden presentar cuatro infecciones por Dengue durante su vida. <sup>(2)</sup>

El vector principal del Dengue es el mosquito *Aedes aegypti* el cual está presente en países tropicales y como consecuencia de esto la tercera parte de la población mundial esta en riesgo de infección. <sup>(3)</sup>

La crisis económica que obligó a la migración acelerada de la población durante e inmediatamente después de la segunda guerra mundial contribuyó a la diseminación de la enfermedad hacia otras áreas geográficas dando como resultado la reintroducción a algunas áreas libres de la enfermedad. <sup>(3)</sup> Durante la segunda mitad del siglo XX un aumento acelerado en el número de viajeros y el déficit en las medidas de salud pública empeoró la situación. <sup>(3)</sup>

Reportes epidemiológicos revelaron que los mayores niveles de infección por Dengue han sido en el año 2001 y que actualmente tiene una distribución global similar a malaria. <sup>(3)</sup>

En Nicaragua, la infección por el virus del Dengue es una de las principales enfermedades transmitidas por vectores. Los primeros casos reportados de

Fiebre por Dengue y Dengue Hemorrágico datan de 1984 y 1985 respectivamente <sup>(4)</sup>

En 1985 se declaró en Nicaragua el primer brote de Dengue con la circulación de los serotipos 1 y 2. <sup>(5)</sup> En 1990 se introdujo el serotipo 4 y el segundo brote ocurrió en 1994 y 1995 identificándose los serotipos 3 y 4. <sup>(6)</sup> La incidencia para los años siguientes fue relativamente baja hasta en 1998 y 1999 que se dió un incremento en el número de casos y se aislaron los serotipos 2,3 y 4. <sup>(7)</sup> A partir del año 2001 hasta la fecha la incidencia ha venido disminuyendo notoriamente a excepción del 2005 cuando hubo un ligero incremento. <sup>(8)</sup>

En León para la década de los 90 se registra un incremento de infecciones por cada año incluyendo el Dengue hemorrágico, para los años 2000 el panorama ha cambiado, según registros del sistema de vigilancia de la ciudad de León a partir del 2003 la prevalencia de casos confirmados de Dengue clásico y Dengue hemorrágico ha venido disminuyendo; de 243 casos de Dengue clásico confirmados para el 2002 disminuyó a 83 casos para el 2003 con un descenso en los años siguientes; en el caso del Dengue hemorrágico de 19 casos confirmados para el 2002 ya para el 2003 solamente se reportaron 9 casos. <sup>(9)</sup> En el 2004 los casos confirmados por Dengue se redujeron a menos de 1000. No obstante a pesar de su descenso en la actualidad esta enfermedad continúa siendo un problema de salud pública, ampliamente distribuido en todo el territorio Nacional. <sup>(9)</sup>

Actualmente los principales factores que favorecen grandes epidemias por el virus del Dengue, lo constituyen la gran cantidad de viajeros a áreas endémicas, la resistencia desarrollada por el mosquito a los insecticidas y la ausencia de una vacuna eficaz contra este virus. <sup>(3)</sup> Esto significa que el combate contra el vector depende en gran medida de los recursos humanos y económicos que en los países en desarrollo regularmente son muy precarios, provocando el fracaso de planes de control sistémico sobre todo en ciudades con una creciente urbanización y en las que existe aumento en la densidad de población. <sup>(3)</sup>

León es un municipio que por sus características ecológicas, sociales y económicas favorecen la presencia y circulación del virus del Dengue; ésta situación permite el desarrollo de brotes epidémicos de Dengue clásico y hemorrágico; es por ello que se hace necesario mejorar el conocimiento del comportamiento de las infecciones por Dengue en el área, lo que fortalecerá la vigilancia epidemiológica de la infección en el Municipio de León.

El conocimiento de la seroprevalencia de personas ya infectadas por el virus Dengue tanto en niños como en adultos será un aporte importante ya que esto permitirá determinar la probabilidad que tienen estas personas de desarrollar Dengue Hemorrágico; dicha información servirá para tomar conciencia de la necesidad urgente de contar con medidas de control y prevención adecuadas para el control del vector y por ende para la reducción de la enfermedad.

## **Planteamiento del problema**

¿Cual es la seroprevalencia del virus del Dengue y los serotipos circulantes en el municipio de León, Nicaragua durante el periodo de Agosto 2006- Diciembre 2008?

## **Objetivos**

### **Objetivo General:**

- Determinar la seroprevalencia y los serotipos circulantes del virus del Dengue en el municipio de León, Nicaragua.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar la seroprevalencia de Dengue en el municipio de León.
- Describir las características epidemiológicas asociadas a la infección causada por el virus Dengue.
- Determinar la prevalencia de Anticuerpos IgM e IgG anti Dengue en pacientes con sospecha de infección aguda por el virus del Dengue.
- Identificar los serotipos circulantes en pacientes con infección aguda del virus Dengue.
- Describir las características clínicas asociadas a la infección causada por el virus del Dengue en pacientes sintomáticos.

## Marco Teórico

El Dengue es una de las enfermedades virales más importantes en humanos, es transmitido por mosquitos y constituye un gran problema de salud pública tanto en regiones tropicales como subtropicales. <sup>(10)</sup> Es clínicamente reconocida desde hace más de 200 años, existiendo evidencia de circulación del virus en las Américas y reemergiendo en los últimos 50 años. <sup>(10)</sup>

Los virus causantes del Dengue (DENV) son miembros de la familia Flaviviridae y género Flavivirus, incluyen cuatro serotipos distintos pero antigénicamente relacionados (DENV-1,-2,-3, y -4) en el complejo antigénico DENV. <sup>(11)</sup> Estos son virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, la mayoría pero no todos requieren de artrópodos hematófagos (mosquitos o garrapatas) para completar su ciclo de transmisión horizontal. <sup>(11)</sup>

Los Flavivirus son responsables de un amplio espectro de manifestaciones patogénicas en humanos, animales domésticos y aves; se encuentran ampliamente distribuidos en casi en todo el mundo excepto Antártica; más del 50% de todos los Flavivirus conocidos han sido asociados con enfermedades humanas incluyendo algunos de los patógenos humanos más importantes tales como el Virus de la Fiebre Amarilla (YFV), Dengue (DENV), Virus de Encefalitis Japonesa (JEV) y el Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV). <sup>(11)</sup> El género Flavivirus incluye 56 especies entre estas el Virus de la Fiebre Amarilla el cual fue uno de los primeros agentes causantes de enfermedad en humanos (juntamente con DENV) fue el primer virus aislado cuya transmisión involucraba al mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* como vector y el primer Flavivirus cultivado in Vitro. <sup>(11)</sup>

## **Características Generales del Virus Dengue**

Son virus esféricos de aproximadamente 40 a 60 nm. de diámetro, su genoma esta protegido por una cápside proteica la cual esta rodeada por una envoltura lipoproteica que presenta pequeñas proyecciones en su superficie las que al microscopio representan la glicoproteína de la envoltura. <sup>(12)</sup>

Debido a la presencia de envoltura lipídica son susceptibles a las lipasas y solventes lipídicos como el cloroformo y la acetona los que llevan a la inactivación de estos agentes. En general son sensibles a los pH ácidos y temperaturas elevadas, luz ultravioleta, irradiación gamma, y diferentes desinfectantes como alcohol, yodo, fenol, cloro entre otros. <sup>(12)</sup>

## **Proteínas Estructurales**

El virión maduro esta constituido por tres proteínas estructurales, la proteína de la cápside (C) la glicoproteína de envoltura (E) y la de membrana (M); la glicoproteína (prM) es el precursor de la proteína M, ésta última presente en el virión maduro. <sup>(12)</sup> Las proteínas M y E están asociadas a la envoltura lipídica, la proteína E se considera la de mayor importancia desde el punto de vista estructural y funcional; en ella radican las principales funciones biológicas como hemaglutinación (capacidad de aglutinar eritrocitos de ganso), neutralización, enlace del virión a los receptores celulares, así como fusión endosomal a pH bajos. <sup>(12)</sup>

## **Proteínas No Estructurales**

La glicoproteína NS1 esta presente en la célula, en su superficie y en forma extracelular, se le ha asignado un papel en la replicación viral y es capaz de inducir cierto grado de inmunidad protectora, posiblemente por lisis celular mediada por complemento. <sup>(12)</sup>

La proteína NS3 está muy conservada entre los Flavivirus. Se considera la proteasa viral aunque también tiene función helicasa y trifosfatasa. Esta aporta

un elevado número de epitopes de células T de importancia en la protección y en la patógenia de las infecciones por Flavivirus. <sup>(12)</sup>

La proteína NS5 es la mas conservada entre los flavivirus y se considera la ARN polimerasa viral. Tiene además actividad metiltransferasa.

Poco se conoce de las funciones de las proteínas NS2a, NS2b, NS4a y NS4b. <sup>(12)</sup>

### **Transmisión del virus Dengue**

El virus Dengue es transmitido a humanos por la picadura de mosquitos *Aedes* infectados. Un mosquito puede infectarse cuando se alimenta de un individuo que tiene el virus circulando en ese momento en sangre. El virus entonces se reproduce en el mosquito durante un periodo de 8-10 días (dependiendo de las condiciones ambientales tales como la temperatura) antes de ser transmitido a otros seres humanos mientras se alimenta. Una vez que se ha infectado, el mosquito permanece así por el resto de su vida. Se cree que los monos también pueden infectarse por los virus y pueden servir como reservorio. <sup>(13)</sup>

### **Vector del Virus Dengue**

El principal vector de DENV es el mosquito *Aedes aegypti*, una especie antropofílica que se ha adaptado extremadamente bien al ambiente urbano, se encuentra tanto en interiores como en exteriores en proximidad con los humanos. <sup>(14)</sup>

Se cree que *A. aegypti* se originó en las junglas de África y fue esparcido al resto del mundo a través de los esclavos y embarcaciones de intercambio durante los siglos XVII-XIX. <sup>(14)</sup> Antiguamente las epidemias de Dengue estaban correlacionadas con la diseminación del *A. aegypti* en el Sur y Sureste de Asia, apareciendo primero en pueblos portuarios e islas. <sup>(14)</sup>

Actualmente el mosquito *A. aegypti* altamente domesticado es un vector eficiente de DENV debido a su preferencia de poner sus huevos en



contenedores artificiales, desafiando a los humanos y permaneciendo en el interior de las casas donde tiene acceso a sus huéspedes favoritos. <sup>(14)</sup>

*A. albopictus* es un vector secundario de DENV en el Sureste de Asia, el Pacífico Oeste y recientemente en incremento en Centro y Sur América, también se ha documentado como el único vector durante ciertas epidemias de Dengue. <sup>(14)</sup>

Antes de 1979 esta especie se encontraba solamente en Asia y el Pacífico Oeste, sin embargo se ha esparcido al resto del mundo en las últimas décadas. <sup>(14)</sup> *A. albopictus* está más confinado al norte que *A. aegypti* ya que sus huevos suelen ser resistentes a temperaturas de congelación, lo cual aumenta la posibilidad de que *A. albopictus* pueda contribuir a una re-emergencia de Dengue en Estados Unidos o Europa. <sup>(14)</sup>

### **Riesgo de Infección por el Virus del Dengue**

La exposición a un mosquito *A. aegypti* infectado determina el riesgo de adquirir Dengue. Evadiendo al mosquito y eliminando los sitios de multiplicación alrededor de las casas y lugares de trabajo, un individuo puede mitigar ese riesgo, sin embargo hay factores más allá del control inmediato de los individuos. <sup>(14)</sup>

La mayoría de casos reportados en Estados Unidos y otros países desarrollados son de viajeros que regresan de países endémicos, los bajos índices pueden atribuirse a una infraestructura mejorada, como buenas fuentes de abastecimiento de agua por tuberías, lo cual elimina los sitios favoritos del vector como son los contenedores de agua, el aire acondicionado y energía eléctrica con pocas interrupciones, los protectores en las ventanas y puertas, patios cerrados, son variables que reducen la exposición de las personas a los mosquitos. Por lo tanto es evidente que una alta incidencia de la enfermedad esta correlacionada con un bajo nivel socio económico. <sup>(14)</sup>

### **Factores responsables del Incremento en la Incidencia**

Los factores responsables del resurgimiento dramático del Dengue y emergencia de epidemias de Dengue Hemorrágico como un problema global

de salud pública en los últimos 17 años parecen estar asociados con los cambios demográficos y sociales de los últimos 50 años. (15)

- El crecimiento de la población global asociado a un proceso creciente de urbanización, las malas viviendas, hacinamiento, el deterioro en los sistemas de abastecimiento de agua y el manejo de desechos asociados a dicha urbanización, han creado las condiciones ideales para el incremento de la transmisión de enfermedades transmitidas por mosquitos en centros urbanos de países tropicales. (15)
- El déficit en el control efectivo del mosquito en áreas donde el Dengue es endémico ha incrementado de manera dramática la prevalencia. (15)
- El incremento de viajeros provee el mecanismo ideal para el transporte del Dengue y otros patógenos urbanos entre centros poblacionales del mundo. (15)
- El déficit en la infraestructura de salud pública en la mayoría de los países en los últimos 30 años y la falta de recursos, ha conducido a un estado crítico de especialistas entrenados que entiendan y puedan desarrollar programas efectivos de prevención y control para enfermedades transmitidas por vectores. (15)

### **Evolución de la enfermedad febril causada por el Virus del Dengue**

Los primeros reportes de grandes epidemias en tres continentes (Asia, África y Norte América) en 1779 y 1780 hacían pensar en una probable enfermedad conocida como Dengue; sin embargo reportes de enfermedades clínicamente compatibles con fiebre por Dengue ocurrieron mucho antes. (15)

El reporte más antiguo encontrado hasta la fecha en una enciclopedia China con síntomas asociados al Dengue fue publicado por primera vez durante la dinastía de Chin (265 - 420 AD) y fue formalmente editado en 610 AD y nuevamente en 992 AD; la enfermedad era conocida por los chinos como agua

envenenada y se pensaba que estaba relacionada con insectos voladores asociados de alguna manera con el agua. (15)

Brotos de una enfermedad en las Indias Francesas del Oeste en 1635 y en Panamá en 1699 pudieron también haber sido a causa del Dengue. (15) Así pues el Dengue o una enfermedad muy similar tenían ya una distribución geográfica muy amplia desde antes del siglo XVIII cuando la primera pandemia conocida por Dengue inició. (15)

Los patrones de la enfermedad asociada al Dengue desde 1780 a 1940 fueron caracterizados por epidemias relativamente infrecuentes pero a menudo de gran magnitud; sin embargo el virus de esta enfermedad se convirtió en endémico en muchos centros urbanos tropicales durante este tiempo, debido a sus periodos interepidémicos; cuando aparentemente no había transmisión de la enfermedad, inmigrantes no inmunes contraían la enfermedad después de pocos meses de su llegada. (15)

### **Emergencia del Dengue Hemorrágico**

La disrupción ecológica en el sureste de Asia y el Pacífico durante y después de la segunda guerra mundial crearon las condiciones ideales para el incremento de la transmisión de enfermedades transmitidas por mosquitos, fue en esta época cuando dió inicio una pandemia global de Dengue. (15) Con el incremento de la transmisión epidémica y la hiperendemicidad (cocirculación de múltiples serotipos del virus) se desarrolló en ciudades del sureste de Asia el Dengue hemorrágico. (15)

La primera epidemia conocida de Dengue hemorrágico ocurrió en Manila, Filipinas en 1953-1954 pero en 20 años la enfermedad en forma epidémica se diseminó al sureste de Asia; para mediados de 1970 el Dengue hemorrágico se había convertido ya en una de las principales causas de hospitalización y muerte en niños de la región. (15)

Antes de 1980 se conocía poco sobre la distribución del virus del Dengue en África pero desde entonces grandes epidemias causadas por 4 serotipos han

ocurrido en el Este y Oeste de África. <sup>(10,15)</sup> Brotes fueron más comunes en los años 90 en el Este de África y Este Central, con mayores epidemias en Djibouti en 1991 y en Jeddah, Arabia Saudita en 1994, ambos fueron los primeros brotes en esos países después de casi 50 años. <sup>(10,15)</sup>

Durante 1980 y 1990 la transmisión epidémica se intensificó, causando una distribución geográfica expansiva tanto de los mosquitos vectores como del virus, y por ende un incremento en la incidencia de la enfermedad y la emergencia de Dengue Hemorrágico en muchos países nuevos. <sup>(10, 15)</sup>

### **Dengue en las Américas**

La primera descripción de una enfermedad semejante al Dengue en el continente americano se relacionó con un brote ocurrido en Filadelfia, EE. UU, en 1780. <sup>(15)</sup> En Brasil las epidemias ocurrieron en 1846–1853. En los años 60, dos pandemias de Dengue afectaron el Caribe y Venezuela (1963, 1968 y 1969) aislándose los serotipos 3 y 2 respectivamente. <sup>(15)</sup>

Los cambios epidemiológicos en las Américas han sido los más dramáticos. En 1950, 1960 y gran parte de 1970 las epidemias por Dengue eran raras en la región Americana debido a que el vector principal (*Aedes aegypti*) había sido erradicado de casi toda Centro América y Sur América. <sup>(15)</sup>

El programa de erradicación fue discontinuado a inicios de 1970 y los mosquitos vectores empezaron a reinvadir los países de los cuales había sido erradicado; para 1990 *A. aegypti* ya casi cubría la misma distribución geográfica que tenía antes de iniciar el programa de erradicación; epidemias por Dengue siguieron a la reinfestación de países por *A. aegypti*. <sup>(15)</sup>

Para 1980 la región Americana experimentó mayores epidemias por Dengue en países que habían estado libres de la enfermedad por muchos años. <sup>(15)</sup> Nuevas cepas y serotipos del virus fueron introducidos (DENV-1 en 1977, una nueva cepa de DENV-2 en 1981, DENV-4 en 1981 y una nueva cepa de DENV-3 en 1994). Fue así que muchos países de la región pasaron de un estado de no endémico (sin enfermedad endémica) o hipo endémico (presencia

de un serotipo) a un estado híper endémico (presencia de múltiples serotipos) y surgieron epidemias por Dengue hemorrágico, como había ocurrido en el Sureste de Asia 25 años antes. <sup>(15)</sup> Entre 1981 a 1997, 24 países Americanos habían reportado casos confirmados por laboratorio de Dengue Hemorrágico, el 96% de los casos eran provenientes de Colombia, Nicaragua, México, Venezuela y Cuba. <sup>(15)</sup>

La primera gran epidemia de Dengue Hemorrágico ocurrió en Cuba en 1981 la cual se asoció al serotipo 2 y ocurrió 4 años posteriores a la introducción del serotipo 1 en la isla. <sup>(4,13)</sup> desde entonces el Dengue Hemorrágico se esparció por el resto del Caribe así como Centro y Sur América, apareciendo la segunda epidemia de Dengue Hemorrágico en la región Americana para 1990 en Venezuela. <sup>(16)</sup>

Entre 1985-1988 se reportaron episodios esporádicos de DHF/DSS con un reducido número de casos en Curacao, Puerto Rico, Honduras, Surinam, México, Aruba, Republica Dominicana y el Salvador, mientras que en Costa Rica y Panamá no se habían reportado casos hasta 1992, ya en 1993 ocurrieron epidemias en ambos países; facilitando la diseminación de la enfermedad desde México en el Norte, a Bolivia, Brasil, Ecuador y Paraguay en el Sur los cuales presentaron epidemias con grandes proporciones producidas por DENV- 1; con excepción de Chile, Canadá y Bermudas el resto de los países de América estaba ya infestado con el vector *Aedes aegypti*. <sup>(16)</sup> Para 1998, más de 616.000 casos de Dengue, incluyendo 11,000 casos de Dengue Hemorrágico, fueron reportados en las Américas. <sup>(17)</sup>

En el año 2000 se aisló el DENV- 3 por primera vez en Cuba causando una epidemia de DF/DHF en la ciudad de la Habana durante 2001-2002<sup>(14)</sup>

En Brasil este mismo serotipo había sido introducido desde 1998, sin embargo los primeros casos reportados como propios de la región por DENV- 3 no fueron detectados sino hasta el año 2000 llevando a epidemias explosivas en todo el país; las epidemias continuaron en los años 2006-2007 con más de 600,000 infecciones humanas documentadas. La actividad del Dengue también incremento en Centro América y México, alcanzando un pico en el 2007 <sup>(11)</sup>

El comportamiento epidemiológico del Dengue en el 2007 fue influenciado por el fenómeno del Niño, con brotes en Bolivia, Brasil, Costa Rica, Guyana Francesa, Honduras, Martiniqués, México, Paraguay, Perú y Puerto Rico; fue considerado como un año epidémico, con 900,782 casos reportados, las segundas cifras más altas en la historia de la enfermedad; de estos casos 26,413 fueron Dengue Hemorrágico, señalando un incremento en la forma más severa de la enfermedad, ligada a la circulación de los cuatro serotipos del virus en varios países de la región. <sup>(18)</sup>

### **Dengue en Nicaragua**

En 1958 Nicaragua fue nombrado libre del mosquito *Aedes aegypti*. <sup>(4)</sup> En 1967 el país fue nuevamente infestado con el agente transmisor del virus del Dengue; a pesar de grandes esfuerzos de erradicación; los primeros casos reportados de Fiebre por Dengue y Dengue Hemorrágico datan de 1984 y 1985 respectivamente. <sup>(4)</sup>

En 1985 se declara en Nicaragua el primer brote de Dengue con 17,483 casos sospechosos de Dengue clásico y 7 muertes por Dengue Hemorrágico, atribuidas al serotipo 1 y 2. <sup>(5)</sup> Después de ese brote se notificaron casos esporádicos y en 1990 la introducción del serotipo 4 resultó en más de 4,000 casos. <sup>(7)</sup>

El segundo brote ocurrió en 1994 y 1995 con 24,669 y 19,260 casos de Dengue respectivamente, durante este periodo 6 muertes fueron reportadas y los serotipos identificados fueron DENV-3 y DENV-4, la región más afectada fue el pacífico siendo Managua y León los departamentos con mayores incidencias. <sup>(6)</sup>

Durante los siguientes 2 años la incidencia de Dengue fue relativamente baja sin embargo el número de casos incremento abruptamente en 1998 y 1999 con 14,016 y 12,468 casos sospechosos de Dengue respectivamente. <sup>(8)</sup> Para 1999, 12 muertes fueron reportadas y los serotipos circulantes fueron DENV-2, DENV-3 y DENV-4. <sup>(8)</sup>

En el año 2001, 16,588 casos sospechosos de Dengue fueron reportados con 21 muertes siendo DENV-1 y DENV-2 los serotipos identificados, todos estos brotes ocurrieron en la temporada lluviosa de Septiembre, Octubre y Noviembre. <sup>(8)</sup>

A partir del 2001 los casos reportados de Dengue Clásico y Dengue Hemorrágico han venido en descenso en Nicaragua según los reportes de la OMS.<sup>(8)</sup> Para el 2002 se reportaron 2,157 casos de Dengue Clásico y 157 de Dengue Hemorrágico; la incidencia disminuyó notoriamente en los años subsiguientes tanto así que para el 2004 se reportaron 1,035 casos de Dengue Clásico y 93 de Dengue Hemorrágico, se presentó un ligero incremento en el año 2005 en relación con el año anterior con 1,735 casos de Dengue Clásico reportados y 177 de Dengue hemorrágico, sin embargo para los siguientes 3 años el número de casos siguió disminuyendo y ya para el año 2008 solamente se reportaron 1,424 casos de Dengue Clásico y 34 de Dengue Hemorrágico. <sup>(8)</sup>

El panorama en la ciudad de León sigue una tendencia similar, en 1985 cuando se declaró en Nicaragua la primera epidemia de Dengue por los serotipos 1 y 2, en León se aisló el serotipo 1, con un 40% de la población sensibilizada, lo que predispuso a la presentación de casos de Dengue Hemorrágico en 1992. <sup>(9)</sup>

Para el segundo brote a finales de 1994 e inicio de 1995 en el cual se reportaron más de 20,000 casos aislándose serotipo 3 en la mayoría de los casos; la región más afectada fue el pacífico siendo León el departamento con mayor incidencia. <sup>(9)</sup> a partir de entonces se han presentado pocos casos reportados por el Silais de León siendo el mayor repunte en el año 2002 cuando se reportaron 243 casos confirmados de Dengue clásico, sin embargo para este año hubo un descenso en el número de casos confirmados de Dengue hemorrágico de 24 reportados en el 2001 se reportan 19 para el 2002; en los dos años siguientes el número de casos confirmados de Dengue clásico disminuyó considerablemente a 89 en el 2003 y 49 en el 2004 y fue hasta en el año 2005 que se observó un ligero incremento a 110 casos, sin embargo no tan alto como el del año 2002. <sup>(9)</sup>

Para los últimos 3 años (2006-2008) los casos reportados de Dengue clásico han sido pocos 23, 40 y 18 respectivamente y para el año en curso hasta la semana 19 solamente se reportan 3 casos. (9)

Desde su introducción a Nicaragua en 1985 hasta el presente los cuatro serotipos del virus han circulado en el país, siendo un serotipo el predominante en cada epidemia; DENV-3 ha circulado desde 1994-1998, DENV-2 fue el serotipo dominante desde 1999-2002 y DENV-1 se convirtió en el serotipo predominante en el 2003 (19)

Estos datos demuestran la tendencia que ha tenido la enfermedad durante los últimos años; en esta situación inciden un grupo de macrofactores (Ambientales, económicos, políticos y sociales) que actúan con mucha fuerza sobre el problema del Dengue y que están relacionados con su reemergencia y con la situación actual en el mundo y en la región de las Américas.

En la actualidad más de 2.5 billones de personas viven en áreas donde el Dengue es endémico, siendo el Dengue Clásico la causa de mayor enfermedad y muerte que cualquier otra enfermedad por Arbovirus en humanos. Los virus del Dengue causan entre 50 y 100 millones de casos de enfermedad febril aguda cada año, incluidos más de 500,000 casos notificados de las formas graves de la enfermedad, como, el Dengue hemorrágico y el síndrome de choque por Dengue una de las principales causas de hospitalización y muerte en niños. (1)

### **Manifestaciones Clínicas en la infección por el virus Dengue**

La infección del virus del Dengue puede ser asintomática o producir una fiebre indiferenciada, fiebre del Dengue o fiebre hemorrágica del Dengue. Las características clínicas de DF dependen a menudo de la edad del paciente. Los lactantes y preescolares pueden sufrir una enfermedad febril indiferenciada con erupción maculopapular, los niños mayores y los adultos pueden tener una enfermedad febril leve o bien una clásica enfermedad incapacitante de inicio abrupto. (15)



**Fiebre por Dengue Clásico:** Por lo general se manifiesta por signos y síntomas clínicos como: fiebre alta, náuseas o vómitos, cefalea retroorbital, erupción cutánea, mialgia, artralgia y astenia, los cuales son independientes de la evolución, fatal o no, del paciente. No son infrecuentes las hemorragias cutáneas (con una prueba de torniquete positiva y/o petequias), suele encontrarse leucopenia y ocasionalmente se observa trombocitopenia. La tasa de letalidad es sumamente baja. DF puede acompañarse en muchas epidemias de complicaciones hemorrágicas como: epistaxis, gingivorragia, hemorragia gastrointestinal, hematuria e hipermenorrea. (15)

**Fiebre por Dengue Hemorrágico:** Se caracteriza por cuatro manifestaciones clínicas fundamentales: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia y a menudo, insuficiencia circulatoria. La trombocitopenia de moderada a intensa con hemoconcentración simultánea es un hallazgo característico. El cambio fisiopatológico principal que determina la gravedad de la enfermedad en DHF y lo distingue de DF es la extravasación del plasma. (15)

**Síndrome del Shock del Dengue:** Hay un deterioro súbito del estado del paciente luego de una fiebre de pocos días de duración. Entre el 3<sup>er</sup> y 7<sup>mo</sup> día del inicio, al ceder la fiebre aparecen signos de insuficiencia circulatoria como: piel fría, húmeda y congestionada, se puede observar cianosis perioral y el pulso se debilita y acelera con reducción de la presión de pulso (20 mmHg o menos) o hipotensión. Algunos pacientes se tornan inquietos y agitados y luego entran en una etapa crítica de shock. El dolor abdominal agudo es una molestia frecuente poco antes de sobrevenir el shock.

Los pacientes están en peligro de muerte y si no se les administra de forma oportuna el tratamiento indicado, pueden pasar a una etapa de shock profundo (presión arterial y pulso imperceptibles). En la mayoría de los pacientes el estado de conciencia se altera hasta en la etapa terminal.

La duración del shock es corta; el paciente puede morir en 12–24 horas o recuperarse con rapidez después de un apropiado reemplazo de líquidos. (15)

## **Patogénesis**

La patogénesis del Dengue Hemorrágico y del síndrome de Shock por Dengue todavía es controversial. Existen dos teorías que se plantean frecuentemente para explicar los cambios patogénicos que ocurren en el Dengue Hemorrágico y el Síndrome de Shock por Dengue. <sup>(15)</sup>

La más comúnmente aceptada es la conocida como infección secundaria o teoría del pecado original. <sup>(20)</sup> Esta hipótesis plantea que los pacientes que experimentan una segunda infección con un serotipo del virus del Dengue heterólogo tienen un riesgo significativamente más elevado de desarrollar DHF y DSS. Los Anticuerpos anti Dengue heterólogos preexistentes reconocen los virus infectantes y forman un complejo Antígeno-Anticuerpo, el cual se une e internaliza por medio de receptores Fc de la inmunoglobulina en la membrana celular de los leucocitos especialmente macrófagos. Debido a que el Anticuerpo es heterólogo el virus no es neutralizado y se encuentra libre para replicarse una vez dentro del Macrófago. <sup>(15)</sup>

Así pues la hipótesis plantea que debido a una infección previa, por un proceso conocido como reconocimiento dependiente de Anticuerpos se permite la infección y replicación del virus Dengue en las células del linaje mononuclear. Se conoce que estas células producen y secretan mediadores vasoactivos en respuesta a la infección por Dengue, lo cual causa un incremento en la permeabilidad vascular llevando a hipovolemia y shock. <sup>(15)</sup>

La otra hipótesis plantea que los virus Dengue, como todos los virus varían y cambian genéticamente como resultado de procesos de selección. Por ejemplo cuando estos se replican en humanos y/o mosquitos aparecen algunas cepas virales que tienen más potencial epidémico que otras. La expresión fenotípica de cambios genéticos en el genoma del virus puede incluir un incremento en la replicación del virus y viremia, severidad de la enfermedad (virulencia) y potencial epidémico. <sup>(15)</sup>

Estas hipótesis no son mutuamente exclusivas y probablemente ambas sean válidas. <sup>(15)</sup>

## **Inmunidad**

En personas que nunca han estado en contacto con Flavivirus suele desarrollarse una respuesta primaria contra el virus, compuesta principalmente de la producción de IgM, este tipo de Anticuerpos aparecen en el 50 % de los pacientes durante la fase febril de la infección primaria (3-5 días del inicio de la fiebre) y en el otro 50% suelen aparecer durante la fase de recuperación. El pico de producción de Anticuerpos IgM ocurre alrededor de 2 semanas después de iniciados los síntomas y en general persisten durante 30-90 días, aunque pueden permanecer niveles detectables de Anticuerpos hasta 8 meses después de la infección. (21)

Los anticuerpos IgG anti Dengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5<sup>to</sup>-6<sup>to</sup> día del comienzo de los síntomas en una primoinfección y estos presentan su pico hacia los 15-21 días. Después declinan y permanecen detectables poco más o menos durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas; permanecen elevados durante varias semanas y luego van declinando. (21)

## **Diagnóstico**

Existen dos métodos básicos para establecer un diagnóstico de infección por Dengue en el laboratorio:

1. Detección del virus (cultivos)
2. Detección de Anticuerpos (Serología)

Hasta hace poco la detección viral implicaba la recuperación del virus en cultivos, sin embargo actualmente existen procedimientos que pueden detectar el ARN del virus y estructuras antigénicas específicas. (21)

### **Muestras utilizadas en el diagnóstico**

Una vez que el individuo es picado por un mosquito infectado con cualquiera de los 4 serotipos, se produce un período de incubación intrínseca alrededor de 7-10 días de duración, durante el cual ocurre la replicación viral, que es máxima 2-3 días antes del comienzo de los síntomas y desaparece hacia el 5to-6to día de la enfermedad. (21)

Para la detección del agente viral se recomienda la toma de muestras de sangre durante el período febril y sobre todo antes del 5<sup>to</sup> día del inicio de la enfermedad. El suero o plasma debe ser procesado casi inmediatamente o en su defecto almacenado a -70 °C. (21)

Para el diagnóstico serológico se recomienda la toma de una muestra de suero después del 5<sup>to</sup> día de inicio de los síntomas; para la determinación de anticuerpos IgM. El estudio de muestras pareadas de sueros (tomadas en los primeros 7 días de comienzo de los síntomas y 14 a 21 días después) permite determinar el incremento en el título o la seroconversión de anticuerpos IgG. Varios autores han demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre papel filtro tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG; éste método se recomienda en estudios serológicos masivos, en la vigilancia serológica y en el estudio de muestras en niños pequeños. (21)

Recién se ha demostrado la utilidad de la saliva para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti Dengue, se han observado niveles relativamente comparables a los observados en el suero de los pacientes, además se ha demostrado la utilidad de la detección de anticuerpos IgA para el diagnóstico de infección reciente. (21)

### **Aislamiento e Identificación Viral**

Los métodos tradicionales de aislamiento del virus Dengue son la inoculación de ratones recién nacidos, cultivos celulares y mosquitos. (21)

Las líneas celulares mas utilizadas son: LLCMK2 (riñón de mono) las Vero (riñón de mono) y BHK21 (riñón de hámster). Las líneas celulares obtenidas a partir de mosquitos son las más sensibles y de más amplio uso para el

aislamiento pero en general, todas requieren de un período de adaptación hasta lograr títulos virales aceptables. (21)

La identificación viral puede realizarse por ensayos de Inmunofluorescencia (IF) y Neutralización por reducción del número de placas (PNRP) utilizando sueros híperinmunes y anticuerpos monoclonales específicos de tipo. (21)

### **Diagnóstico Serológico**

En el Dengue se observan principalmente dos tipos de respuesta serológica:

- **Respuesta Primaria**

La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a Flavivirus.

- **Respuesta Secundaria**

La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por Dengue, los que han padecido previamente una infección por Flavivirus.

La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de los 4 serotipos virales posibilita que se produzcan incluso infecciones terciarias y cuaternarias.

(21)

En los individuos que sufren una primoinfección, los Anticuerpos IgG anti Dengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5<sup>to</sup>-6<sup>to</sup> día de comienzo de los síntomas, los cuales son máximos hacia los 15-21 días después declinan y permanecen detectables poco más o menos durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas; permanecen elevados durante varias semanas y luego van declinando. Esta elevación significativa permite el diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad. (21)

Los Anticuerpos IgM anti Dengue que se producen en respuesta a la infección se desarrollan rápidamente y hacia el 5<sup>to</sup> día de la enfermedad la mayoría de los individuos presentan cantidades detectables. En general, estos Anticuerpos IgM declinan hacia niveles no detectables entre los 30-90 días del comienzo de los síntomas. Se ha observado que un pequeño número de individuos que sufren una infección secundaria por Dengue, pueden no presentar niveles de Anticuerpos IgM. La concentración, especificidad y duración de los Anticuerpos IgM anti Dengue es variable y depende en gran medida del individuo.

En general, los Anticuerpos IgM muestran algún grado de reactividad cruzada entre los serotipos del Dengue, independientemente de la severidad de la enfermedad y el tipo de infección (primaria o secundaria). También se ha observado cierto grado de reactividad cruzada con otros Flavivirus como fiebre amarilla (YF) y encefalitis japonesa. (21)

El diagnóstico serológico del Dengue es complicado, por causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los 4 serotipos y los Flavivirus en general. (21)

## **ELISA**

En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas inmunoenzimáticos (ELISA) para el diagnóstico del Dengue. Estos son económicos, rápidos y fáciles de ejecutar; muestran a su vez elevada sensibilidad y especificidad cruzada, lo que los hace de gran utilidad como pruebas de “tamizaje”. (21)

La detección de Anticuerpos IgM se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la vigilancia del Dengue y Dengue Hemorrágico; resulta el método de elección en la mayoría de los laboratorios; diferentes kits han sido desarrollados recientemente con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. La mayoría de los sistemas se basan en un ELISA de captura de Anticuerpos IgM que incluyen los 4 serotipos virales, lo que incrementa la sensibilidad al sistema. (21)

Recientemente se ha desarrollado un sistema visual de tira reactiva (PanBio) que permite la detección de Anticuerpos IgM en menos de 5 minutos, el sistema, que se basa en una cromatografía, muestra niveles de sensibilidad y especificidad de 99 y 96 %, respectivamente. (21)

Talarmin y otros demostraron la utilidad de la detección de Anticuerpos IgA para el estudio de la infección reciente de Dengue. El sistema mostró 100 % de sensibilidad y especificidad al compararlo al ELISA de captura de IgM, aunque esta última se detectó como promedio a 3,8 días de comienzo de los síntomas y la IgA a 4,6. (21)

### **Inhibición de la hemaglutinación**

Los virus del Dengue son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso; esto ha permitido que la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) sea aplicada en el estudio serológico de monosueros y pares de sueros, con la utilización de Antígenos de los 4 serotipos producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa acetona. (21)

### **Prueba de neutralización por reducción de placas**

La prueba de neutralización por reducción de placas (PNRP) es un ensayo sensible y específico, que permite la detección de Anticuerpos neutralizantes al virus Dengue. Estos Anticuerpos son muy estables en el tiempo. La PNRP es considerada de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos por su elevada especificidad, lo que permite identificar el serotipo causante de una infección pasada. También ha sido utilizada en la identificación de los virus del Dengue. (21)

Tanto la IH como la PNRP requieren de muestras de sueros pareadas en los casos sospechosos de la enfermedad, así como destreza en su ejecución. En general son técnicas demoradas en su ejecución. (21)

## **Detección molecular**

### **Hibridización**

La hibridización de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos, específicamente el dot blot; con la utilización de ARN extraído de células infectadas con el virus y de pools de mosquitos *Aedes albopictus*, infectados con probes biotinilados o probes marcados con P32. La detección mediante probes biotinilados es menos sensible que la que utiliza probes marcados con isótopos radiactivos y no es de gran utilidad en la identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que se haya realizado una amplificación previa del material genético. (21)

### **Reacción en cadena de la Polimerasa**

Con estudios de PCR se puede identificar un fragmento de 511 pb, la cual es seguida de una PCR nested donde se utilizan cebadores específicos para cada serotipo. Este método ha demostrado su utilidad en el diagnóstico del Dengue, presenta una sensibilidad de hasta  $10^3$  DICT50 en sueros virémicos y mosquitos infectados. (21)

La PCR es ampliamente utilizada en el diagnóstico del Dengue porque permite la detección del agente de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares y en larvas infectadas; así como en muestras de tejidos frescos y embebidas en parafina en fallecidos por FHD. (21)

A su vez ha permitido determinar la presencia de infecciones concurrentes por 2 serotipos. Además de su utilidad como un método de diagnóstico rápido, también ha sido empleado en el estudio genómico de cepas de Dengue, lo que permite por medio del análisis mediante enzimas de restricción o secuenciación nucleotídica la clasificación de las cepas en genotipos. (21)

La PCR en la vigilancia del Dengue es de gran utilidad, ya que permite detectar con rapidez la introducción de un nuevo serotipo en un área mediante el estudio de muestras de sueros de pacientes y de pools de mosquitos *Aedes*.

(21)



### **PCR en tiempo Real**

Además de la detección del genoma viral como método diagnóstico, su cuantificación es de gran importancia como un marcador de severidad de la enfermedad. Recién se han reportado varios estudios que han abierto la posibilidad de cuantificar el ADNc viral. TaqMan, Laue y otros aplicaron un protocolo de amplificación automatizado que permitió medir la cantidad de ADNc durante el proceso de amplificación. Por su parte Huo-Shu y otros desarrollaron un RT-PCR fluorogénico que permitió cuantificar el material amplificado. <sup>(21)</sup>

En la actualidad el diagnóstico del Dengue está dirigido principalmente a la vigilancia epidemiológica y es una necesidad urgente el contar con métodos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad y en consecuencia, la toma de medidas terapéuticas adecuadas para el tratamiento y control del paciente. Su utilidad principal actual radica en la detección de la circulación de alguno de los serotipos en un área geográfica determinada, caracterización de las cepas circulantes, estimación de la incidencia de la enfermedad una vez controladas las epidemias, confirmación de los casos de FHD y diagnóstico diferencial con otras entidades. Se necesitan métodos sensibles, específicos, rápidos, tempranos y baratos, que permitan por una parte el diagnóstico etiológico en el paciente y por otra brindar un pronóstico de la enfermedad. <sup>(21)</sup>

### **Prevención y Control**

La prevención del Dengue y Dengue Hemorrágico se basa principalmente en el control del vector; un programa permanente de prevención y control debe incluir los siguientes componentes:

- Manejo integrado del vector: combinando una vigilancia sistemática del vector, saneamiento ambiental y control biológico y químico.
- Vigilancia de la enfermedad y tratamiento, basado en los sistemas de salud local.
- Proveer de agua potable, saneamiento y manejo de desechos sólidos.
- Educación en salud, comunicación del sistema de salud pública y participación de la comunidad. <sup>(13)</sup>

La vigilancia entomológica es requerida para detectar los cambios en la distribución y abundancia del vector así como para evaluar la efectividad de los programas de control y permitir la toma de decisiones para una adecuada intervención. Las poblaciones de larvas de *A. aegypti* son fácilmente monitoreadas y los índices de abundancia son comúnmente utilizados:

**Los principales Índices utilizados en el control del *Aedes aegypti* son:**

**Índice de infestación de Viviendas:** El índice de una localidad se obtiene multiplicando por 100 el número de viviendas encontradas con *Aedes aegypti* y dividiendo el resultado de la multiplicación por el total de viviendas inspeccionadas en el área.

$$\text{Índice de viviendas} = \frac{\text{\# Casas infestadas}}{\text{\# Casas inspeccionadas}} \times 100$$

Se considera que la infestación de una localidad es elevada cuando el índice de Infestación por Vivienda es de 3 % o más, mediana, si el índice es de más de 1 % pero menor que 3 % y baja cuando el índice es de 1 % ó menos.

$$\text{Índice de recipientes} = \frac{\text{\# Depósitos positivos}}{\text{\# Depósitos inspeccionados}} \times 100$$

El índice de depósitos como tal solo establece una relación de los porcentajes de los depósitos positivos con relación al total de los inspeccionados con agua. La aplicación real de este indicador se encuentra en establecer que tipos de depósitos ocupan los mayores porcentajes y así establecer las recomendaciones pertinentes para su debido control.

$$\text{Índice de Breteau} = \frac{\text{\# Depósitos positivos}}{\text{\# Depósitos inspeccionados}} \times 100$$

## # Casas inspeccionadas

El índice de Breteau, relaciona los depósitos con presencia de larvas del vector con el número de casas inspeccionadas, y se podría aplicar también para conocer la cantidad de depósitos de cada tipo positivos por las viviendas inspeccionadas (Ej. # de barriles positivos x 100 casas inspeccionadas; # de depósitos artificiales positivos x 100 casas inspeccionados etc.)<sup>(22)</sup>

El saneamiento ambiental de *A. aegypti* incluye la mejora en los suministros y almacenamientos de aguas, manejo de desechos sólidos y la modificación de los hábitats artificiales de los mosquitos; la falta de agua potable en una comunidad o vecindario conlleva a las familias a almacenar agua en contenedores que pueden infestarse con larvas de mosquitos.<sup>(13)</sup>

Los sistemas de almacenamiento de agua caseros pueden diseñarse para prevenir la ovoposición de mosquitos o la emergencia de adultos. Hábitats larvarios potenciales tales como pilas, floreros, tinajas, fuentes, canales de techo y recipientes de agua para los perros deben inspeccionarse y limpiarse frecuentemente. Contenedores de descarte (latas, botellas, baldes, tasas etc.) Latas y llantas usadas que recolectan agua de lluvia deben recogerse y botarse o reciclarse.<sup>(13)</sup>

Los contenedores de agua para tomar pueden tratarse utilizando larvicidas orgánicos fosforados como el temephos o insecticidas para el rociado focal y perifocal o para el rociado espacial, del tipo de los orgánicos fosforados o piretroides. El rociado espacial con máquinas especiales, mochilas o incluso aéreo es una eventualidad excepcional, que se reserva en caso de epidemia para bajar la población de mosquitos adultos. Contrario a lo que se supone, es de baja efectividad y no afecta a las larvas.<sup>(13)</sup>

El espectro del control biológico abarca desde el sembrado de *Bacillus thuringiensis* en colecciones de agua, que actúa matando las larvas del vector por acción de una toxina del soma bacteriano, hasta la siembra de artrópodos (pulgas de agua) que se alimentan de las larvas, o la manipulación genética

para alterar la descendencia del vector. Todas estas medidas requieren de voluntad política y activa participación comunitaria. (13)

A juzgar por la progresión de la enfermedad en casi todo el mundo, es indudable que las medidas de lucha antivectorial han fracasado en todos los países. La falta de éxito no es solo un problema de presupuesto, sino de hechos muy complejos que tienen relación con la sociedad y la cultura humana. *Aedes aegypti* convive estrechamente con el hombre. Por tal razón, el descuido de políticas ambientales, la crisis socioeconómica, los fenómenos migratorios asociados a urbanizaciones precarias, el cambio climático global, por citar algunos ejemplos, pueden ser señalados como responsables de esta realidad.

(23)

No existen vacunas disponibles pero por primera vez en 60 años los esfuerzos por crearla se ven prometedores.

Cepas de cada uno de los cuatro serotipos de Dengue, atenuados por pasaje en cultivos de tejidos o por tecnología de ADN recombinante, han sido formuladas en vacunas tetravalentes que han progresado exitosamente a las fases 1 y 2 de ensayos clínicos en Estados Unidos y Sureste de Asia. (24)

Con la iniciativa de la vacunación pediátrica contra el Dengue (Fundación de Bill y Melinda Gates) la organización mundial de la salud, la industria, el ejército de Estados Unidos y gobiernos de países tropicales están colaborando para acelerar el desarrollo de la vacuna del Dengue y la eficacia de los ensayos de la fase 3 en países donde el Dengue es endémico. (24)

Una vacuna tetravalente de protección contra el Dengue existirá pronto si éste puede ser controlado. (24)

## **Diseño Metodológico**

**El presente trabajo de investigación se realizó en dos fases:**

- a) En la primera fase se realizó un estudio descriptivo de corte transversal para establecer la seroprevalencia del Dengue en el área urbana de León.
  
- b) En la segunda fase se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en pacientes que acudieron a las Unidades de Salud con síndrome febril agudo para establecer el o los serotipos circulantes.

### **Área de estudio:**

La ciudad de León está ubicada al nor-occidente del país en las coordenadas 12° 11' 24" de latitud Norte y 86° 41' 26" de longitud Oeste. Limita al norte con los municipios de Posoltega y Telica, al sur con el océano Pacífico, al este con los municipios de La Paz Centro y Larreynaga y al oeste con el departamento de Chinandega. Posee una extensión territorial de 5,138.03 km<sup>2</sup> y en la actualidad cuenta con una población de 441,308 habitantes distribuidos en sus municipios: León (Cabecera departamental), Nagarote, La Paz Centro, Quezalguaque, Posoltega, Telica, Larreynaga, El Jicaral, Santa Rosa del Peñon, El Sauce y Achuapa. León ha sido la sede intelectual de la nación, con una universidad fundada en 1813; es también un importante centro industrial y de comercio de Nicaragua.

El sistema de salud esta constituido por un hospital escuela (HEODRA) ubicado en el centro de la ciudad y tres grandes centros de salud: Perla Maria Norori que comprende la región suroeste, Mantica Berio comprende la región noroeste, y Sutiaba en el oeste de la ciudad, cada uno de estos centros tienen una cobertura de repartos dentro del territorio del área urbana y comarcas en el

área rural con varios puestos de salud para acceso a toda la población de la región.

## FASE I

### Estudio de Seroprevalencia en el Municipio de León.

**Tipo de estudio:** Descriptivo de corte transversal.

**Población de estudio:** Habitantes del área urbana de León.

**Muestra:** 813 personas del casco urbano de la ciudad.

#### Calculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó haciendo uso del programa Epi Info 6.04 y fue ajustada con las siguientes consideraciones:

- Efecto de diseño = 2
- Tasa de rechazo, migración y fichas incompletas. (10%)

Con una frecuencia esperada del evento en estudio de 60%, un error esperado de 5% y un intervalo de confianza de 95%

#### Population Survey or Descriptive Study Using Random (Not Cluster) Sampling

Population Size	:	Infinite
Expected Frequency:		60.00 %
Worst Acceptable	:	65.00 %
Confidence Level		Sample Size
-----		-----
80 %		158
90 %		260
<b>95 %</b>		<b>369</b>
99 %		637
99.9 %		1,038
99.99 %		1,451

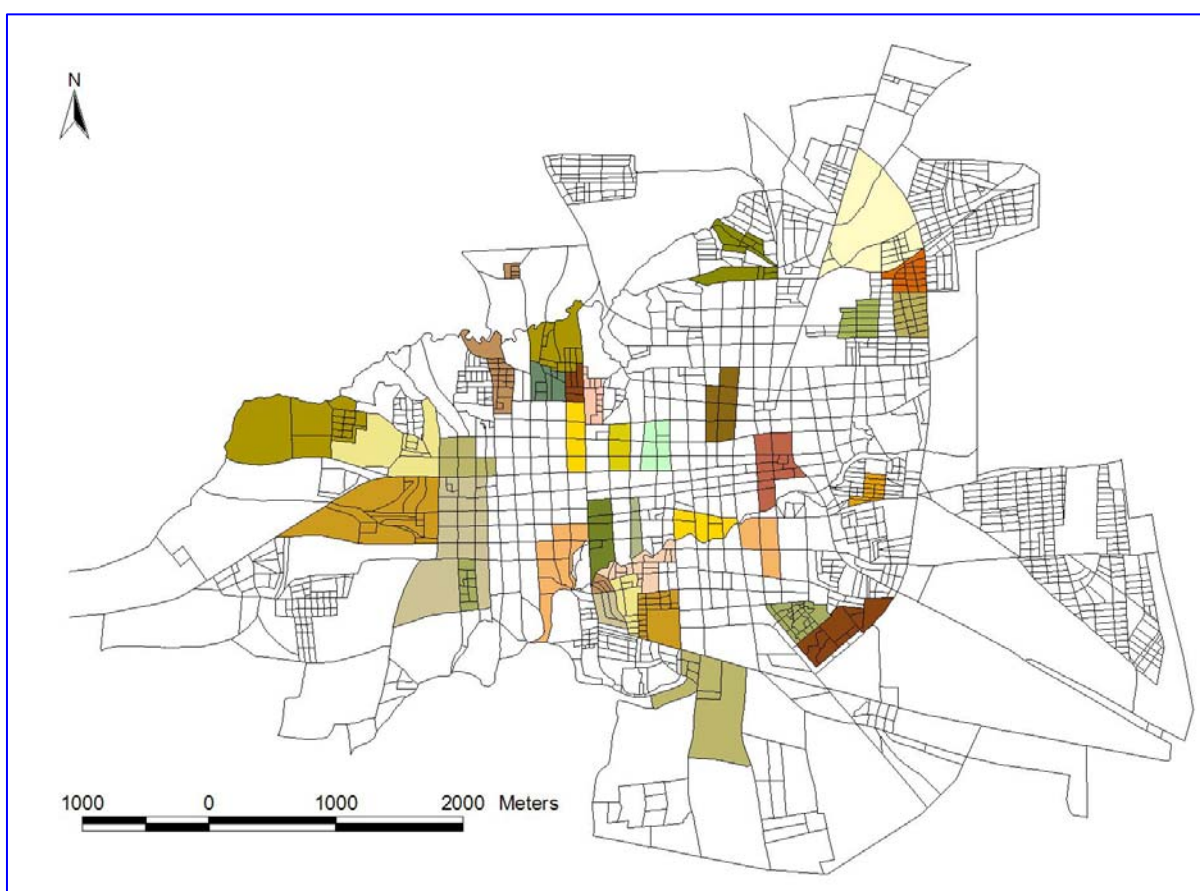
Tamaño de muestra final:  $369 * 2 * 1.1 = 812$  participantes

### **Selección de la muestra:**

Para seleccionar las 813 personas que formaron parte del estudio de seroprevalencia se utilizó la base de datos que lleva el Centro de Investigación en Demografía y Salud (CIDS) la cual cuenta con datos de 55,000 habitantes localizados en 11,000 casas. Este tamaño muestral representa el 27 % de la municipalidad de León.

Se aplicó un muestreo aleatorio por conglomerado para el cual el primer paso fue definir y seleccionar los estratos del área de estudio del CIDS (Áreas de salud: Mantica, PMN, Sutiaba) y como segundo paso seleccionar aleatoriamente las personas de la base de datos que representaran cada estrato; los participantes se seleccionaron de acuerdo con el tamaño de cada estrato, se obtuvo una representación del 1.5% del territorio Mantica, 1.2% del Perla y 1.7% de Sutiaba.

Mapa del área urbana del Municipio de León. Cada área coloreada representa los estratos seleccionados del CIDS



**Periodo de Estudio:** Agosto de 2006 - Febrero 2007

**Criterios de inclusión**

- Personas mayores de 2 años de edad
- En caso de ser menores de edad que sus padres o responsables estuviesen de acuerdo en participar en el estudio.
- Que habitaran en la ciudad de León (área urbana)
- Que no presentaran signos ni síntomas de ninguna enfermedad al momento de la toma de muestra.

**Recolección de la información:**

El estudio seroepidemiológico se llevó a cabo visitando a las personas seleccionadas casa a casa, se les explicaron los objetivos del estudio y una vez que aceptaron participar firmaron un consentimiento informado y en su defecto las personas analfabetas brindaron su huella digital la cual plasmaron con tinta, posteriormente se llenó un cuestionario que contenía datos demográficos y epidemiológicos.

**Recolección de la muestra:**

A cada participante del estudio se le tomó de 3 a 5 ml de sangre venosa a través de la realización de una punción y en tubos sin anticoagulante, limpios, estériles y debidamente identificados. Luego las muestras fueron transportadas en termos calibrados a temperatura de 4 – 8°C hacia el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas para sus respectivos análisis.

**Procesamiento de la muestra:**

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante un tiempo de 5 minutos, para separar el paquete globular del suero. A partir del suero de los



participantes del estudio se realizó la detección de anticuerpos IgG e IgM usando Dengue IgG Indirect ELISA (EDEN01G Lot. 06045) y Dengue IgM capture ELISA (EDEN1M Lot.05305) ambas de la casa comercial panbio diagnostics. (Brisbane, Australia).

La interpretación de los resultados fue establecida de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Ver procedimiento en Anexos)

### **Análisis de los datos:**

Los datos obtenidos de las fichas fueron almacenados en una base de datos diseñada en el programa SPSS, Inc. Chicago, IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0.1, una vez completada la información y los resultados de laboratorio se procedió a realizar el análisis descriptivo de los datos sociodemográficos y la seroprevalencia.

Los cálculos de los intervalos de confianza del 95% y la razón de prevalencia (obtenido como el cociente entre la prevalencia de los expuestos entre la prevalencia de los no expuestos) para establecer algún tipo de asociación, se realizaron con el programa EPIDAT PAHO, Spain (Análisis Epidemiológico de datos tabulados) Versión 3.1

### **Consideraciones éticas:**

- Se respetó la voluntad de los individuos de aceptar o rechazar su participación en el estudio.
- La información fue manejada solamente por el grupo de investigación.
- Los datos del estudio fueron utilizados solo para fines del mismo.
- El estudio fue sometido al comité de Ética de Investigaciones biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León, llenando las expectativas metodológicas y lineamientos de la declaración de Helsinki se aprobó en el año 2000 (Acta N° 23)

## Operacionalización de variables

### FASE I

<b>Variabes</b>	<b>Concepto</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala o Valores</b>
Edad	Tiempo de vida en años expresado por el participante al momento de la entrevista.	Años cumplidos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2-5 años</li> <li>2. 6-14 años</li> <li>3. 15-24 años</li> <li>4. 25-44 años</li> <li>5. 45-65 años</li> <li>6. 66 o más</li> </ol>
Sexo	Condición de genero que distingue a las personas biológicamente	Entrevista	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Masculino</li> <li>2. Femenino</li> </ol>
Ocupación	Labor, actividad técnica o profesional que desempeñaban los participantes al momento de la entrevista	Entrevista	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estudiantes</li> <li>2. Ama de casa</li> <li>3. Obreros</li> <li>4. Profesional</li> <li>5. Comerciante</li> <li>6. Agricultor</li> <li>7. Infantes</li> <li>8. Sin empleo</li> </ol>
Fuente de agua	Procedencia del	Entrevista	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Potable</li> </ol>

	agua para ingesta diaria de los participantes		<ol style="list-style-type: none"> <li>2. Puesto Publico</li> <li>3. Pozo</li> <li>4. Río</li> </ol>
Criaderos de mosquitos	Lugares que puedan servir como medio de crecimiento, desarrollo y permanencia de mosquitos y larvas	Entrevista y Observación	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pilas</li> <li>2. Barriles</li> <li>3. Botellas</li> <li>4. Piletas</li> <li>5. Desechos Plásticos</li> <li>6. Floreros</li> <li>7. Maceteras</li> <li>8. Tinajas</li> <li>9. Llantas</li> <li>10. Chatarra</li> </ol>
Índices de Infestación	Índices utilizados para el monitoreo de mosquitos Aedes aegypti en recipientes y viviendas de los participantes	información del Silais León	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Índice de Viviendas</li> <li>2. Índice de Recipientes</li> </ol>
Seropositividad IgM Dengue	Presencia de Anticuerpos IgM contra el virus del Dengue	Niveles de Absorbancias del ELISA	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Negativo</li> <li>2. Positivo</li> </ol>
Seropositividad IgG Dengue	Presencia de Anticuerpos IgG contra el virus del Dengue	Niveles de Absorbancias del ELISA	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Negativo</li> <li>2. Positivo</li> </ol>

## **FASE II**

### **Estudio de casos Agudos:**

**Tipo de Estudio:** Descriptivo de corte transversal

**Población de Estudio:** 132 casos sospechosos de Dengue captados en los tres grandes centros de Salud de la ciudad de León: Perla María Norori, Mantica Berio y Sutiaba, los cuales presentaron síndrome febril en el periodo de estudio.

**Periodo de Estudio:** Junio de 2007- Diciembre 2008

#### **Criterios de Inclusión:**

- Personas de cualquier edad
- En caso de ser menores de edad que sus padres o responsables estuviesen de acuerdo en participar en el estudio.
- Que fueran procedentes del municipio de León, indistintamente área urbana o rural.
- Que presentaran signos o síntomas indicativos de infección aguda por el virus del Dengue.
- Que acudieran a los centros de la salud de la ciudad de León.

#### **Recolección de la información**

Los casos sospechosos que acudieron a los tres centros de salud eran captados por el medico tratante el cual les explicaba los objetivos del estudio y pedía el consentimiento informado para participar, una vez que este aceptaba lo manifestaba por escrito (con firma o huella digital) y se procedía a llenar una

ficha de recolección de información que contenía datos generales y sintomatología presentada por el paciente. (Ver en Anexos)

#### **Recolección de la muestra:**

En las instalaciones de cada centro de salud a cada paciente captado se le tomó 2 muestras de sangre venosa, se recolectaron 2ml con anticoagulante para exámenes de rutina que se utilizaron como recurso auxiliar en el diagnóstico de infección por Dengue los cuales se realizaron en el laboratorio del centro de salud (biometría hemática completa y recuento de plaquetas) se recolectó también una muestra de 5 ml sin anticoagulante la cual fue transportada al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Medicas para realizar los análisis respectivos.

#### **Procesamiento de la muestra:**

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante un tiempo de 5 minutos, para separar el paquete globular del suero. A partir del suero se realizó la detección de anticuerpos IgG e IgM usando Dengue IgG Indirect ELISA (EDEN01G Lot. 09051) y Dengue IgM capture ELISA (EDEN01M Lot. 08058) ambas de la casa comercial panbio diagnostics (Brisbane, Australia).

La interpretación de los resultados fue establecida de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Ver procedimiento)

También se identificaron los serotipos causantes de la infección (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) desarrollada por Lanciotti et al (1992) <sup>(25)</sup> esta técnica utiliza cebadores consenso localizados en los genes C y PreM obteniéndose un fragmento de 511 pb y es seguido de un PCR nested, donde se utilizan cebadores específicos para cada serotipo. La técnica se optimizó para adaptarla a las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, haciendo leves modificaciones en los tiempos de termociclaje. (Ver procedimiento en Anexos) Este procedimiento se le realizó a todas aquellas muestras provenientes de pacientes que presentaran menos de 5 días de evolución

**Análisis de los datos:**

Los datos obtenidos de las fichas fueron almacenados en una base de datos diseñada en el programa SPSS, Inc. Chicago IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0.1, una vez completada la información y los resultados de laboratorio se procedió a realizar el análisis descriptivo de los datos sociodemográficos y la seroprevalencia. Los cálculos de los intervalos de confianza del 95% se realizaron con el programa EPIDAT PAHO, Spain (Análisis Epidemiológico de datos tabulados) Versión 3.1

**Consideraciones éticas:**

- Se respetó la voluntad de los pacientes de aceptar o rechazar su participación en el estudio.
- La información fue manejada solamente por el grupo de investigación.
- Los datos del estudio fueron utilizados solo para fines del mismo.
- El estudio fue sometido al comité de Ética de Investigaciones biomédicas de la Facultad de Ciencias Medicas UNAN-León, llenando las expectativas metodológicas y lineamientos de la declaración de Helsinki se aprobó en el año 2000 (Acta N° 23)

## Operacionalización de variables

### FASE II

<b>Variables</b>	<b>Concepto</b>	<b>Indicador</b>	<b>Valores</b>
Edad	Tiempo de vida en años expresado por el participante al momento de la entrevista.	Años cumplidos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\leq 1</math> año</li> <li>2. 2-5 años</li> <li>3. 6-14 años</li> <li>4. 15-24 años</li> <li>5. 25-44</li> <li>6. 45 o más</li> </ol>
Sexo	Condición de genero que distingue a las personas biológicamente	Ficha de recolección de datos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Masculino</li> <li>2. Femenino</li> </ol>
Procedencia	Lugar de residencia habitual del participante	Ficha de recolección de datos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Urbano</li> <li>2. Rural</li> </ol>
Manifestaciones Clínicas	Presencia de signos y síntomas considerados desde el inicio de la enfermedad	Ficha de recolección de datos	1. Síntomas y signos específicos de Dengue
Seropositividad IgM Dengue	Presencia de Anticuerpos IgM	Niveles de Absorbancias	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Negativo</li> <li>2. Positivo</li> </ol>

	contra el virus del Dengue	de ELISA	
Seropositividad IgG Dengue	Presencia de Anticuerpos IgG contra el virus del Dengue	Niveles de Absorbancias de ELISA	1. Negativo 2. Positivo
Prueba de Reacción en cadena de la polimerasa	Detección del ARN viral	Resultado de electroforesis	1. Positivo 2. Negativo
Serotipificación	Determinación del serotipo del virus Dengue mediante Nested - PCR	Resultado de electroforesis	1. DENV-1 2. DENV-2 3. DEN V-3 4. DENV- 4



## Resultados

### FASE I

Durante el período de Agosto 2006-Febrero 2007 un total de 813 muestras sanguíneas fueron recolectadas del área urbana de León correspondiente a las tres grandes áreas de salud de la ciudad: Sutiaba 292 (35.9%) Perla María Norori 290 (35.7%) y Mantica 231 (28.4%) La edad promedio fue 29.3 (DS: 18.9) y la distribución por edad, sexo y características sociodemográficas de la población de estudio se detallan en la tabla 1

**Tabla 1. Características sociodemográficas de los participantes del estudio, municipio de León en el periodo de Agosto 2006-Febrero 2007**

<b>Características sociodemográficas</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	366	45
Femenino	447	55
<b>Edad (años)</b>		
2-5	36	4.4
6-14	168	20.7
15-24	186	22.9
25-44	246	30.3
45-65	135	16.6
66 a más	42	5.2
<b>Ocupación u oficio</b>		
Estudiantes	274	33.7
Ama de casa	153	18.8
Obreros	149	18.3
Profesional	119	14.6
Infantes (No aplica)	57	7
Comerciante	30	3.7
Sin empleo	28	3.4
Agricultor	3	0.4

<b>Total</b>	<b>813</b>	<b>100</b>
--------------	------------	------------

Basados en la presencia de Anticuerpos de tipo IgG la seroprevalencia global de Infección por Dengue fue de 93.4% (IC 95%: 91.5 -95.1) de ésta seroprevalencia el 83.5% fueron infecciones primarias y el 10.8% infecciones secundarias. Respecto a la seroprevalencia de Anticuerpos IgM se encontró un 7.9% (IC 95%: 5.9 - 9.7) y del total de muestras analizadas el 5.7 % (IC 95%: 4 - 7.3) resultaron negativos tanto para IgM como para IgG (Tabla 2)

**Tabla 2. Seroprevalencia de Anticuerpos Dengue IgM e IgG en los participantes del estudio**

<b>ELISA</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Ig M</b>	64	7.9	5.9-9.7
<b>Ig G</b>	759	93.4	91.5-95.1
<b>Infección Primaria</b>	679	83.5	80.9-86.1
<b>Infección Secundaria</b>	88	10.8	8.6-13.0
<b>Negativos</b>	46	5.7	4.0-7.3

Al analizar la seroprevalencia de IgG e IgM según área de salud se encontró que la seroprevalencia fue similar en las 3 áreas (Tabla 3)

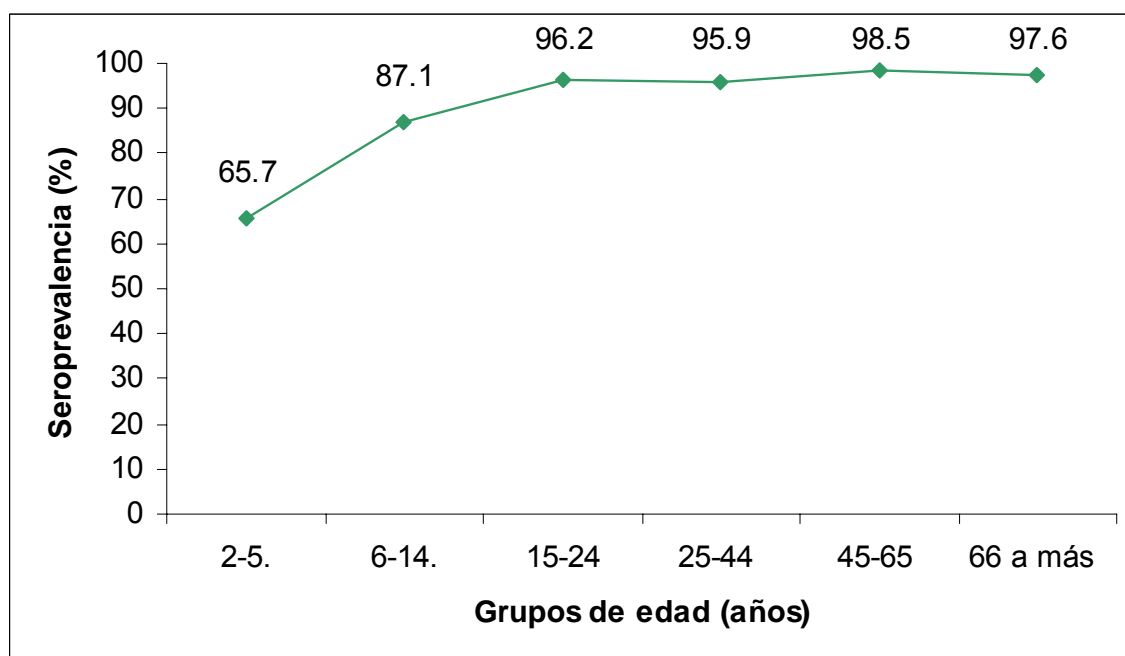
**Tabla 3. Seroprevalencia de Anticuerpos para virus Dengue IgG e IgM según Área de Salud**

<b>IgG</b>	<b>IgM</b>
------------	------------

Área de Salud	N°	%	IC 95%	N°	%	IC 95%
Mantica	219	94.8	91.7-97.8	20	8.7	4.8-12.5
Sutiaba	273	93.5	90.4-96.4	20	6.8	3.7-9.90
Perla Maria Norori	267	92.1	88.7-95.3	24	8.3	4.9-11.6
<b>Total</b>	<b>759</b>	<b>93.4</b>		<b>64</b>	<b>7.9</b>	

La seroprevalencia de Anticuerpos IgG Dengue fue mayor en los participantes del sexo masculino (95%) (IC 95%: 92.7-97.4) en comparación con los del sexo femenino (91.9%) (IC 95%: 89.3-94.5) no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre géneros ( $p:0.1$ ) y al analizar la seroprevalencia según grupos etarios se observa que esta se incrementa con la edad siendo la más baja de 65.7% en niños entre 2-5 años y la más alta de 98.5% en el grupo de 45-65 años. (Figura 1)

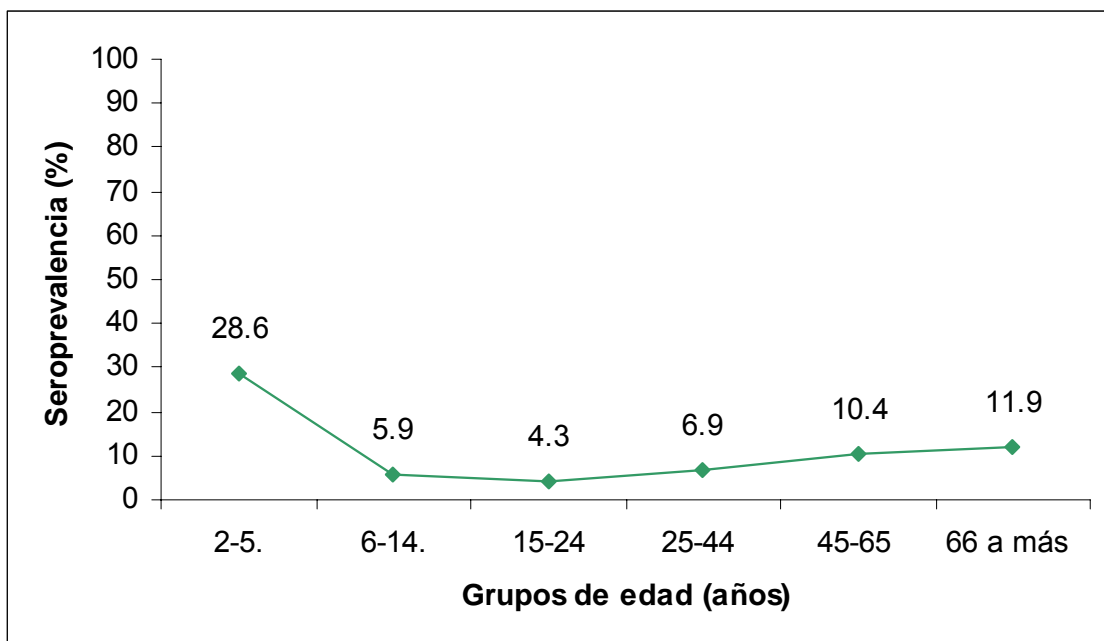
**Figura 1. Seroprevalencia de Anticuerpos IgG Dengue por grupos de edad**



En cuanto a la seroprevalencia de Anticuerpos IgM Dengue ésta fue mayor en los individuos del sexo femenino (8.1%) (IC 95%:5.4-10.6) en comparación con los del sexo masculino (7.7%) (IC 95%: 4.7-10.5) no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p:0.9$ ) y al analizar la seroprevalencia según grupos etarios se encontró la mayor seropositividad en niños de 2-5 años (28.6%) y la menor en el grupo de 15-24 años (4.3%).

(Figura 2)

**Figura 2. Seroprevalencia de Anticuerpos IgM Dengue por grupos de edad**



La mayoría de las viviendas de los participantes del estudio tenían servicio de agua potable (99.3%) sin embargo a pesar de que tenían servicio de agua permanente el 98.5 % almacenaban agua utilizando diferentes recipientes. (Tabla 5) Al relacionar la seropositividad a Dengue IgG e IgM con la presencia de recipientes para almacenar agua limpia y algunos criaderos de mosquitos que se encontraban dentro y fuera de la vivienda no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa, sin embargo probablemente el hecho de tener barriles y pilas con agua almacenada, desechos plásticos y botellas que sirvan de criaderos de mosquitos en los patios de la vivienda, estos sean factores que aumenten las probabilidades de la presencia del vector y por ende que se de un incremento en la seropositividad. (Tabla 5)

**Tabla 5. Razón de Prevalencia de Anticuerpos Dengue IgM e IgG según la existencia de recipientes para almacenar agua y criaderos de mosquitos**

Recipientes para almacenar agua	Frecuencias		IgM			IgG		
	N°	%	RP*	IC 95%	<i>p</i>	RP*	IC 95%	<i>p</i>
Piletas de lavadero	790	97.2	0.9	0.95-1.04	0.8	1.0	0.95-1.06	0.6
Barriles	260	32.0	0.8	0.53-1.50	0.6	1.4	0.88-2.44	0.1
Pilas	134	16.5	0.8	0.45-1.57	0.6	1.2	0.63-2.62	0.4
Tinajas	59	7.3	0.8	0.31-2.27	0.7	0.7	0.32-1.84	0.5
<b>Criaderos de mosquitos</b>								
Chatarra	136	16.4	0.8	0.45-1.58	0.6	0.9	0.52-1.81	0.9
Desechos plásticos	126	15.5	1.2	0.71-2.10	0.4	0.9	0.49-1.71	0.8
Llantas	35	4.3	0.7	0.17-2.88	0.6	0.5	0.20-1.50	0.2

<b>Otros Criaderos de mosquitos</b>								
Floreros	32	3.9	0.7	0.19-3.19	0.7			
Botellas	223	27.4	0.7	0.44-1.19	0.1	1.5	0.85-2.66	0.1
Maceteras	350	43.1	1	0.83-1.44	0.5	1.2	0.85-1.79	0.2

\*RP=Razón de prevalencia

Ya que se identificaron criaderos de mosquitos en las casas; se determinó el índice de infestación de viviendas y se encontró que en el total de las viviendas el índice era de 13% (IV) siendo el porcentaje de depósitos positivos de 3.1% (IR) Al hacer la distribución de los índices por área de salud se encontró que el área del Mantica presentaba los mayores índices de infestación de viviendas y de depósitos (Tabla 6)

**Tabla 6. Índices de Infestación por el *Aedes aegypti* según Área de Salud**

<b>Áreas de Salud</b>	<b>Índice de Recipientes</b>	<b>Índice de Viviendas</b>
Mantica	4.5	15.8
Sutiaba	1.9	11.2
Perla Maria Norori	2.9	12.2

Fuente: Sistema de vigilancia epidemiológica (Silais León)

## Fase II

Durante el período de Junio 2007-Diciembre 2008 se llevó a cabo la vigilancia de pacientes con síndrome febril agudo que eran sospechosos de Dengue y que acudían a las tres grandes áreas de salud del Municipio de León procedentes tanto del área urbana como rural, se lograron captar 132 casos distribuidos según territorio: Sutiaba 89 (67.4%) Perla Maria Norori 1 (0.8%) y Mantica 42 (31.8) La edad promedio fue de 21.5 (DS: 17.1) y la distribución por edad, sexo y ocupación de la población de estudio se detallan en la Tabla 1

**Tabla 1. Características de pacientes con cuadro febril agudo que asistieron a los tres centros de Salud de León con sospecha clínica de Dengue durante el periodo de Junio 2007-Diciembre 2008**

<b>Características</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	57	43.2
Femenino	75	56.8
<b>Edad (años)</b>		
Menor de 1	4	3.0
2-5	14	10.6
6-14	38	28.8
15-24	31	23.5
25-44	29	22.0
45 a más	16	12.1
<b>Procedencia</b>	98	74.2
Urbana	34	25.8
Rural		
<b>Ocupación u oficio</b>		
Estudiantes	64	48.5
Ama de casa	23	17.4

Obreros	21	15.9
Infantes	12	9.1
Profesional	6	4.5
Agricultor	4	3.0
Sin empleo	2	1.5
<b>Total</b>	<b>132</b>	<b>100</b>

La seroprevalencia global de Infección por Dengue fue de 82.6% siendo 85.5% infecciones primarias y 6.8% infecciones secundarias, la sospecha de infección Aguda por Dengue fue confirmada por medio de la determinación de Anticuerpos IgM los cuales se encontraron presentes en el 48.5% de los pacientes con cuadro febril y el 7.6 % de estos estaban libres de infección sin presencia de Anticuerpos IgM ni IgG. Se realizó la prueba de PCR a 117 (88.6%) de los pacientes que tenían menos de 5 días de haber iniciado los síntomas y se encontró al serotipo DENV-2 como causante de 2 infecciones agudas. (Tabla 2)

**Tabla 2. Seroprevalencia de Anticuerpos IgM e IgG para Dengue en los pacientes con cuadro febril agudo que asistieron a los tres centros de Salud de León con sospecha clínica de Dengue durante el período de Junio 2007-Diciembre 2008**

	ELISA	Nº	%	IC 95%
<b>IgM</b>		64	48.5	39.5-57.3
<b>IgG</b>		109	82.6	75.7-89.4
<b>Infección Primaria</b>		113	85.6	79.2-91.9
<b>Infección Secundaria</b>		9	6.8	2.10-11.4
<b>Negativos</b>		10	7.6	2.60-12.4
<b>PCR</b>				
<b>DENV-2</b>		2		



<b>Total</b>	132	100
--------------	-----	-----

La unidad de Salud que reportó mas casos de cuadros febriles que fueron confirmados con IgM positiva para Dengue fue Sutiaba 43 (48.3%) y en cuanto a la prevalencia global de Anticuerpos IgG el territorio Mantica 36 (85.7%) (Tabla 3)

**Tabla 3. Prevalencia de Anticuerpos IgM e I gG Dengue en pacientes con cuadro febril agudo según centro de Salud de Procedencia**

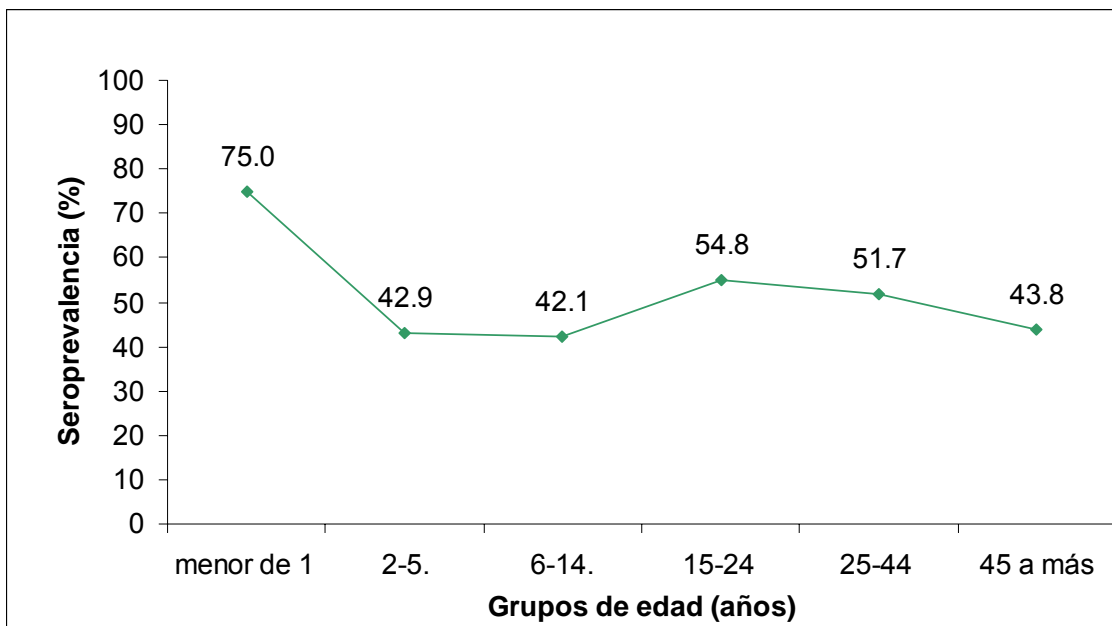
Área de Salud	IgM			IgG		
	N°	%	IC 95%	N°	%	IC 95%
<b>Mantica</b>	20	47.6	31.3-63.9	36	85.7	73.9-97.4
<b>Sutiaba</b>	43	48.3	37.3-59.2	72	80.9	72.1-89.6
<b>Perla Maria Norori</b>	1	100.0	1.20-98.7	1	100.0	1.20-98.7
<b>Total</b>	64	48.5		109	82.6	

La seroprevalencia de Anticuerpos del virus Dengue IgG fue mayor en los participantes del sexo femenino (85.3%) (IC 95%: 76.6-94) en comparación con los del sexo masculino (78.9%) (IC 95%: 67.4-90.4) no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p:0.4$ ) igualmente para los casos confirmados como IgM Dengue positivos existe un predominio en los pacientes del sexo femenino (57.3%) (IC 95%: 45.4-69.1) en comparación con los del sexo

masculino (36.8%) (IC 95%: 23.4-50.2) en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre géneros ( $p:0.03$ )

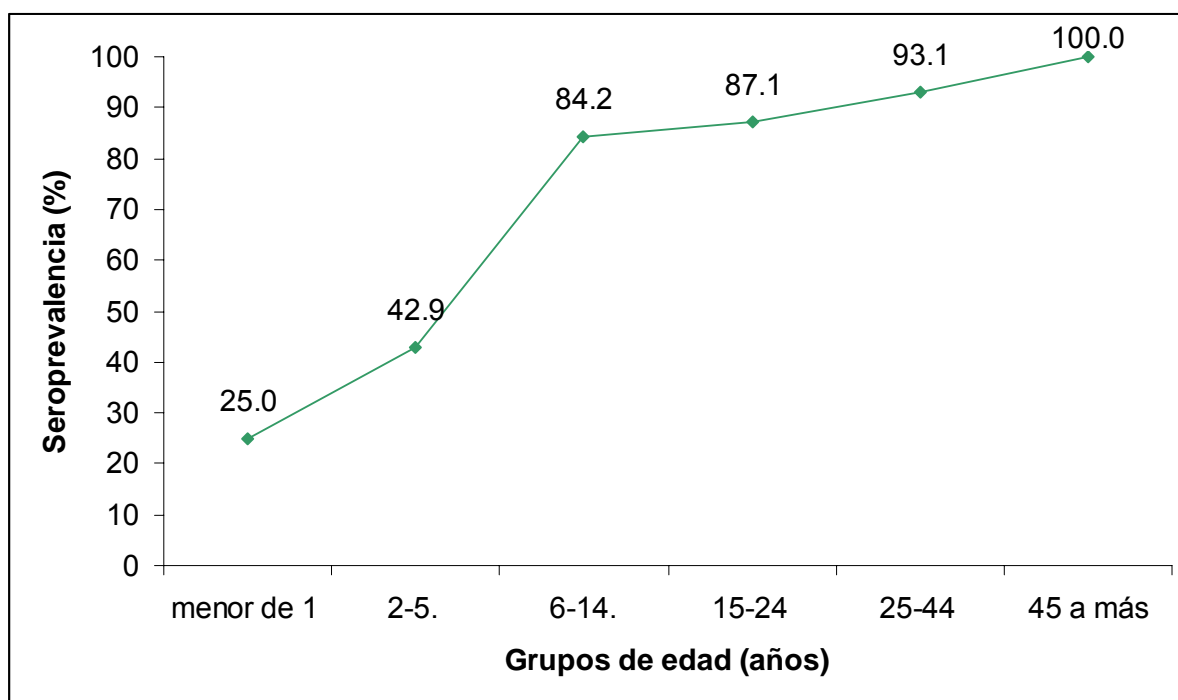
En relación a la seroprevalencia de IgM para dengue por grupos de edad se observa una seropositividad alta en niños menores de un año y la más baja de 42.1% en el grupo de 6-14 años (figura 1)

**Figura 1. Seroprevalencia de Anticuerpos IgM Dengue por grupos de edad**



En la seroprevalencia global a IgG se observa la presencia de Anticuerpos desde temprana edad con niños menores de 1 año que ya presentaban infección por Dengue (25 %) la positividad sigue una tendencia que incrementa con la edad (Figura 2)

**Figura 2. Seroprevalencia de Anticuerpos IgG Dengue por grupos de edad**



Los hallazgos clínicos encontrados en orden de frecuencia se detallan en la tabla 4, una minoría de los pacientes presentaron signos de Dengue hemorrágico como Prueba del torniquete positivo, Petequias, Epistaxis y Gingivorragia.

**Tabla 4. Síntomas y signos clínicos de 64 pacientes seropositivos a Dengue que asistieron a tres centros de Salud de León con cuadro febril y sospecha clínica de Dengue. Junio 2007-Diciembre 2008**

<b>Síntomas</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Fiebre	64	100.0
Cefalea	57	89.0
Mialgias	48	75.0
Artralgias	46	71.9
Dolor retro orbital	47	73.4
Escalofríos	45	70.3
Dolor abdominal	24	37.5
Anorexia	33	51.6
Diarrea	6	9.4
<b>Signos</b>		
Tos	15	23.4
Vómitos	7	10.9
Prueba del torniquete positiva	5	7.8
Rash	5	7.8
Piel fría	4	6.3
Petequias	2	3.1
Disnea	1	1.6
Epistaxis	2	3.1
Ictericia	1	1.6
Hepatomegalia	1	1.6
Gingivorragia	1	1.6

## Discusión

### Fase I

En Nicaragua la primera epidemia documentada de Dengue se presentó en 1985, persistiendo hasta la época actual de forma endémica y surgimiento de brotes en diferentes departamentos del país, <sup>(26)</sup> El departamento de León ha sido uno de los principales afectados por brotes de Dengue desde su aparición en el país, sin embargo hasta la fecha no se conoce la seroprevalencia de Anticuerpos Dengue en la población sana de la ciudad que indiquen exposiciones previas al virus. En el presente estudio se logró detectar una seroprevalencia elevada lo cual incrementa el riesgo de desarrollar Dengue hemorrágico o síndrome de shock por Dengue.

Los altos niveles de Anticuerpos IgG (93.4%) encontrados en la población sana de la ciudad de León indican una intensa actividad del Dengue en años anteriores, en el primer estudio realizado en Nicaragua en 1985 la prevalencia de Anticuerpos anti Dengue fue de 20% en todas las edades y 13% en niños de 5-15 años; (G. Huelva Boniche and A. González, Ministerio de salud, Managua, Nicaragua.) Ya para 1997 un tamizaje serológico demostró una seroprevalencia global de 77% (66% en niños y 81% en adultos) (A. Balmaseda y J. de los Reyes, información no publicada) y para el 2001 en un estudio de seroprevalencia realizado en la ciudad de Managua en el 2001 y 2002 en niños de 4-16 años la seroprevalencia fue de 91% similar a la encontrada en este estudio <sup>(27)</sup> Igualmente estos hallazgos son comparables

con estudios realizados en el Salvador donde la seroprevalencia encontrada en el año 2000 fue de 96% <sup>(28)</sup> y en República Dominicana en el 2002 (98%) <sup>(29)</sup> Pero difieren en otros países como en Costa Rica donde en el 2003 la seroprevalencia en niños sanos procedentes de 2 áreas completamente diferentes fue de 2.9% y 36.9 %<sup>(30)</sup> similar a la encontrada en Brasil en el 2001 de 29.5%.<sup>(31)</sup> y 45% en Singapore <sup>(32)</sup>

Estas cifras demuestran una alta transmisión del virus sobre todo en países subdesarrollados como el nuestro.

En relación a la edad, la seropositividad de IgG se encontró en niveles altos desde los 2 años de edad (65.7%) y se observa un incremento con la edad de 87.1 % a los 6-14 años hasta alcanzar altos niveles en los adultos en los cuales se mantiene estable (96-98%); en los estudios mencionados anteriormente la tendencia es similar y coincide con el incremento acelerado a partir de los 6 años , una explicación a esto es que los niños empiezan la educación formal a esta edad lo que significa que están fuera de sus casas por más tiempo, la mayoría de estos niños asisten a escuelas públicas donde las fuentes potenciales para la permanencia del mosquito del Dengue son mucho más fácil de encontrar. El incremento con la edad indica una exposición acumulativa al virus. Según sexo se encontró que la seroprevalencia de Anticuerpos IgG fue mayor en hombres sin embargo no se encontró diferencia significativa entre géneros ( $p:0.1$ ).

Por otra parte al determinar la seroprevalencia a IgM se observó una seropositividad de 7.9% lo cual revela la ocurrencia de infecciones asintomáticas en la población, lo que representa un foco de transmisibilidad ciega del virus en estos individuos. Infecciones subclínicas e inaparentes causadas por los diferentes serotipos del Dengue han sido documentadas anteriormente, lo cual lleva a una transmisión del virus no detectable por el sistema de vigilancia epidemiológica local. <sup>(33)</sup>

En relación a la edad la seropositividad a IgM fue mayor en niños de 2-5 años (28.6%) y en los mayores de edad a partir de los 45 años (10.4-11.9%) lo cual coincide con la literatura que a éstas edades los riesgos de infecciones virales incrementan ya que son grupos susceptibles y según el sexo la seroprevalencia de IgM fue mayor en mujeres, este hallazgo no es de gran relevancia ya que no se encontró diferencia significativa entre géneros ( $p:0.9$ ).

### **Factores epidemiológicos**

En estudios realizados desde 1998 – 2001 en Nicaragua han demostrado que la mayoría de casos de Dengue que se presentaban a los hospitales y unidades de salud eran en su mayoría infecciones secundarias, aun en niños de corta edad; lo que sugería una alta incidencia de la infección por Dengue y probablemente debido a la circulación de los 4 serotipos simultáneamente en estos períodos;<sup>(7,19)</sup> a diferencia de lo publicado en esos años en éste estudio se encontró que la mayoría de los casos son infecciones primarias 83.5% y solo un 10.8% son infecciones secundarias, esto probablemente debido a la predominancia de circulación del serotipo 2 en los últimos años en comparación con los otros serotipos que han circulando menos. <sup>(9, 19,34)</sup>

En un estudio realizado en una cohorte de niños en Managua los cuales se siguieron por 3 años, (2001-2003) la incidencia de infección se redujo significativamente con un promedio de infecciones secundarias de 11% en el primer año a 6% en el segundo año, el descenso en la incidencia de infecciones por Dengue la atribuyen a esfuerzos del control del vector realizados por el ministerio de salud en una campaña intensa que se llevó a cabo en ese período. <sup>(27)</sup> Cabe recalcar que en los últimos años se ha hecho énfasis en las campañas de reducción de fuentes de criaderos de mosquitos mediante la abatización, la aplicación de insecticidas focales y educación de la población; lo cual ha mostrado buenos resultados ya que se ha notado una disminución significativa en el número de casos reportados por el sistema de vigilancia nacional y local. <sup>(9, 26, 34,35)</sup>

La infección por Dengue esta influenciada por una serie de factores relacionados no solo con el huésped sino también con el entorno, factores relacionados con la vivienda y la comunidad, es por ello que se hizo una descripción de dichos factores, uno de ellos es la fuente de agua en la vivienda y se encontró que el 99.3% de las viviendas contaban con servicio de agua potable; sin embargo debido al mal servicio en el sistema de abastecimiento de agua en la mayoría de los barrios de la ciudad, y por factores culturales, la mayoría de las personas se ven obligadas a recolectar agua y mantenerla almacenada en recipientes (98.5%) lo que contribuye a una potencial fuente de criaderos de mosquitos como principal factor, además de otro tipo de criaderos que se pueden encontrar dentro de la vivienda como floreros, botellas y maceteras y en el entorno como chatarra, desechos plásticos y llantas que pueden almacenar agua durante cierto tiempo y contribuir a la proliferación de mosquitos vectores del Dengue.

En todas las viviendas inspeccionadas se encontraron al menos 2 recipientes que podrían servir como criaderos de mosquitos y por lo tanto se encontró un promedio de índice de infestación de viviendas elevado (IV: 13%) y también de recipientes (IV: 3.1%) Según el Programa Nacional de Control de Dengue del Ministerio de salud los índices entomológicos de infestación de *Aedes aegypti* en Nicaragua son elevados y en los pocos estudios realizados en Nicaragua que miden los factores epidemiológicos del Dengue los índices encontrados coinciden con lo reportado por el sistema de vigilancia. (27)

Al analizar los índices por sector se encontró que el territorio Mantica presenta los más altos (IV: 15.8%) (IR: 4.5%) lo cual puede explicar la alta seroprevalencia encontrada en este territorio (94.8%) en comparación con Perla Maria Norori y Sutiaba.

Una limitante del estudio fue el no poder determinar asociaciones entre la seroprevalencia y los potenciales factores de riesgo debido a la alta frecuencia encontrada del evento (IgG: 93.4%) lo que limita realizar análisis de regresión con múltiples variables donde se pudiera establecer asociación, lo ideal sería realizar un estudio con un grupo control para poder establecer diferencias.



Entre las fortalezas del estudio, una de ellas fue el contar con una muestra representativa de la población del área urbana de León, lo que facilita el poder extrapolar los resultados de seroprevalencia encontrados.

Por otro lado, el utilizar un kit comercial de ELISA para llevar a cabo un número grande de pruebas, como las que se requieren para el tamizaje serológico de Dengue, esta bien documentado. Las pruebas de ELISA tienen la capacidad de detectar todos los serotipos (DENV1-4) y presentan sensibilidad y especificidad similares a la prueba de inhibición de la hemaglutinación la cual es considerada la prueba standard para el diagnóstico del virus del Dengue. A pesar de que se usó un ELISA que también detecta anticuerpos de reactividad cruzada con otros Flavivirus como el virus de la fiebre amarilla, pueden considerarse los resultados obtenidos como realmente infecciones por Dengue ya que en nuestro país la fiebre amarilla ha sido erradicada y la vacuna no esta incluida en el programa nacional de inmunización. <sup>(36)</sup>

## Fase II

En la segunda fase del estudio se describe la seroprevalencia y características clínicas de pacientes sospechosos de una infección por Dengue. La sospecha se confirmó en el 48.5 % de los casos con la presencia de Anticuerpos IgM, como era de esperarse un gran porcentaje de pacientes con sospecha clínica de Dengue clásico no fueron confirmados por medio del laboratorio, ya que la sintomatología de una infección por Dengue no es patognomónica y puede confundirse con otras enfermedades comunes en nuestro medio que comparten la misma sintomatología como malaria, gripe común, IVU entre otras.

Porcentajes similares se han encontrado en varios estudios realizados en nuestro país; en 1994 se confirmó el 43% de los pacientes sospechosos en un estudio donde se describe la reintroducción del serotipo 3 a nuestro país <sup>(14)</sup> para la epidemia de 1998 en un estudio que describe las características clínicas, epidemiológicas y virológicas de la infección, se confirmó el 53% de los pacientes diagnosticados clínicamente<sup>(6)</sup> y en un estudio más reciente publicado en el 2006 se reporta un 62% de casos confirmados como IgM positiva entre 1999-2001 y 88% en el 2003 <sup>(37)</sup>

Se encontró la circulación del serotipo 2, sin embargo este hallazgo debe interpretarse con precaución ya que solamente se detectó en dos pacientes confirmados como infección aguda y que tenían menos de 5 días de presentar

síntomas, una de las posibles causas que limitaron la determinación por medio de RT-PCR es la búsqueda tardía de atención por parte de los pacientes que limita el corto tiempo que se requiere para realizar la prueba a partir del momento que el paciente inicia el cuadro clínico.

Los estudios realizados en la ciudad León por Balmaceda et al reportan que el serotipo 2 ha sido el predominante entre 1999-2002, (27,37,38) se reportan casos de los otros serotipos en menor frecuencia, no existen estudios publicados que reporten el serotipo predominante para el período de este estudio solamente la información brindada por el sistema de vigilancia epidemiológica el cual reporta la circulación de los 4 serotipos en la ciudad de León con la predominancia del serotipo 2 en los últimos años.<sup>(9,34)</sup> Esto puede explicar el bajo porcentaje de infecciones secundarias encontradas en el estudio (6.8%) lo cual también explicaría el descenso en el número de casos en los últimos años.<sup>(9,34)</sup>

Los niños menores de 1 año tienden a infectarse con mayor frecuencia en comparación con los otros grupos etarios sin embargo este resultado debería interpretarse con precaución ya que este grupo se encuentra subrepresentado en la muestra estudiada en comparación con los otros grupos, aunque en un país que ha sido endémico por más de 15 años se espera un pico en niños a temprana edad, en cambio en países con una historia de circulación de Dengue mas corta los casos se presentan en su mayoría en adolescentes y adultos. Sin embargo los estudios realizados han encontrado un pico en niños de 5-9 años no a tan corta edad como la encontrada en este estudio. (7, 19,37)

En relación al sexo se encontró que el grupo con mayor seropositividad a IgM fue del género femenino con diferencias estadísticamente significativas, sin embargo no es considerado como un factor de riesgo y por lo tanto debería someterse a un estudio mas detallado.

También se realizó la determinación de Anticuerpos de tipo IgG lo cual mostró que el 82.6% de los pacientes han estado expuestos al virus en algún momento de su vida, en comparación con la seroprevalencia encontrada en el estudio comunitario en población sana esta es menor probablemente debido al tamaño de muestra no muy significativo de esta segunda fase del estudio; sin embargo sigue una tendencia similar que incrementa con la edad con un repunte a partir de los 6 años (periodo escolar) hasta un 100% en mayores de 45 años, tendencia que coincide con la bibliografía consultada, (27,29,30)

Los síntomas clásicos de Dengue tales como fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y dolor retroorbital estuvieron presentes en más del 70 % de los pacientes confirmados como Dengue, porcentajes similares y en el mismo orden se han reportado en diferentes estudios (6,19)

Todos los casos fueron reportados como Dengue clásico por el medico tratante, sin embargo algunos de ellos presentaron manifestaciones hemorrágicas comunes como prueba del torniquete, petequias, epistaxis en una bajo porcentaje y llama la atención un caso que presentaba hepatomegalia, gingivorragia e ictericia y que fue diagnosticado como dengue clásico, este paciente cursaba con una infección secundaria por lo tanto pudo haberse tratado de un Dengue hemorrágico o síndrome de shock ya que según la OPS la hepatomegalia se ha encontrado frecuentemente en casos de shock (17,39)

Una de las principales limitaciones de este estudio fue el pequeño tamaño de la muestra para este tipo de estudio, la limitación se debió al poco número de casos que se presentaron a las unidades de salud durante el período del estudio, otra limitación fue la dificultad para obtener muestras pareadas de los pacientes y por lo tanto solamente se utilizó la muestra de fase aguda lo que pudo haber llevado a algunos falsos negativos.

Sin embargo a pesar de sus desventajas en el diagnóstico de una infección aguda por Dengue la dificultad para obtener una segunda muestra en la

convalecencia ha llevado a los investigadores a realizar evaluaciones de la utilidad de una sola muestra llegando a la conclusión que un resultado positivo en los primeros días de un síndrome febril compatible con la descripción clínica de Dengue, podría ser considerado confirmatorio en áreas endémicas, debido a que en estas condiciones la probabilidad de que estos Anticuerpos reflejen una infección pasada es baja (40)

Por lo antes mencionado se considera a esta segunda fase como un estudio piloto, los resultados obtenidos solamente dan una pauta de la situación del Dengue en la ciudad León, y por lo tanto se recomienda realizar estudios con más información y tomando en cuenta las limitaciones que se presentan al tratar de estudiar una enfermedad febril aguda como el Dengue.

Los hallazgos encontrados en este estudio son relevantes desde el punto de vista epidemiológico ya que el gran porcentaje de la población que ya ha estado en contacto con el virus incrementa el riesgo de aparición de casos de Dengue Hemorrágico, al igual que la circulación de un serotipo peligroso como es el DENV-2 y la presencia del vector en las viviendas lo que se refleja con los altos índices de infestación encontrados.

## Conclusiones

### Fase I

- La seroprevalencia global del Dengue en la ciudad de León fue de 93.4% e incrementa con la edad desde los 2-5 años con 65.7% hasta 97.6% en mayores de 66 años, se encontró un 7.9% de infecciones asintomáticas en población sana.
- El 83.5% de la población presentó infecciones primarias lo que representa un gran número de infecciones en riesgo de desarrollar las formas clínicas más graves de la enfermedad como el Dengue hemorrágico y el síndrome de shock por Dengue
- La gran mayoría de viviendas inspeccionadas (98.5%) tienen algún tipo de recipiente para almacenar agua y criaderos de mosquitos dentro y fuera de la vivienda, por lo tanto los índices entomológicos de infestación del vector *Aedes aegypti* son altos y en las áreas estudiadas un promedio de índices de infestación de viviendas de 15.8% y de recipientes de 4.5% fue el más alto correspondiente al territorio Mantica que también presentó la mayor seroprevalencia (94.8%)

## **Conclusiones**

### **Fase II**

- Se encontró una prevalencia de Anticuerpos IgM Dengue de 48.5% siendo los niños menores de un año los más afectados (75%), se mantiene estable en los otros grupos etarios entre 42-54%
- La prevalencia de Anticuerpos IgG fue de 82.6% con una tendencia a incrementar con la edad desde 25% en menores de un año hasta 100% en mayores de 45 años.
- Se identificó al serotipo 2 como el causante de dos infecciones agudas.
- Los síntomas clínicos más frecuentemente encontrados en los pacientes con una infección aguda fueron los comunes: fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroorbital entre otros, en menor porcentaje también se presentaron algunas manifestaciones hemorrágicas como prueba del torniquete positiva, petequias, epistaxis, ictericia, hepatomegalia y gingivorragia.

## **Recomendaciones**

Los hallazgos encontrados y la bibliografía consultada nos hacen pensar que el dengue continuará esparciéndose a nivel mundial hasta que exista una vacuna efectiva pero desgraciadamente esto todavía no es posible, mientras tanto los esfuerzos deben enfocarse en las prácticas efectivas de control del vector para prevenir la transmisión

Principalmente los programas de prevención y de control del Dengue y de su vector requieren de acciones encaminadas a lograr la sostenibilidad del ordenamiento del medio ambiente como condición previa para mantener bajos los niveles de infestación con el vector, también es necesario promover la asistencia temprana ante la presencia de los signos de alarma a las unidades de salud con el fin de evitar las formas graves de la enfermedad así como para facilitar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.



## Referencias

1. John R. Stephenson Bulletin of the World Health Organization 2005; 83:308-314.
2. Harrison`s. Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill 16<sup>th</sup> Edition. 2005.p. 6546-6549
3. Halstead SB. Dengue. Current Opinion in Infectious Diseases 2002; 15:471-6.
4. PAHO. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. PAHO Division of Disease Prevention and Control. 2001
5. Kouri G, Valdez M, Arguello L, Guzmán MG, Valdes L, Soler M, Bravo J, Dengue epidemic in Nicaragua, 1985. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991. 33: 365–371.
6. Guzmán MG, Vásquez S, Martínez E, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G, de los Reyes J, Acevedo F, Dengue en Nicaragua, 1994: reintroducción del serotipo 3 en las Américas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996. 121: 102–110
7. Harris E, Videa E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, González A, Amador JJ, Balmaseda A. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000. 63: 5–11

8. PAHO Number of reported cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever; Region of the Americas. Sem 52, 1995-2008.
9. Silais León. Información epidemiológica 1998-2005. (Entrevista Personal Dr Moreno)
10. Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever, its history and resurgence as a global public health problem. New York: CAB International; 1997. P.1-22.
11. Nikos Vasilakis, Scott C. Weaver. The history and evolution of Human Dengue Emergence. *Advances in Virus Research*, Volume 72. 2008 Elsevier Inc.
12. Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología Médica*. Editado por G.F Brooks, S.A Morse, J.S. Butel. El manual moderno 17 Ed. México 2002.
13. WHO. *Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control* (2<sup>nd</sup> Edition). 1997. World Health Organization, Geneva.
14. Kyle Jennifer L. Harris Eva. Global spread and persistente of Dengue. *Annual review of Microbiology* 2008. 62:71-92.
15. Gubler. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, July 1998. p.480-496
16. Organización Panamericana de la Salud, Programa de Enfermedades Transmisibles, División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles. Dengue en las Américas: una actualización. *Bol Epidemiol* 1993; 14:1-3.
17. WHO. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. WHO Fact Sheet No. 117. 1998.
18. PAHO Fact Sheet Dengue. 2009
19. Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, Téllez Y, Saboría SI, Mercado JC, Videá E, Rodríguez Y, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, González A, Campos LA, Amador JJ, Harris E, Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a three-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005. 73: 1063-1070.
20. Deem, Michael W. [The Adaptive Immune Response](#) Rice University
21. Guzmán María G, Vásquez Susana. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. 2002. Instituto de medicina tropical "Pedro Kouri" Revista Cubana med trop..

22. Acevedo Bolaños Francisco. Manual de Técnicas de Control y Vigilancia del *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus*. MINSA. Nicaragua 1989.
23. Seijo Alfredo. El dengue como problema de salud pública. Argentina 2001.
24. Edelman Robert. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore. Clinical Infectious Disease 2007.
25. Lanciotti R.S. Calisher C.H. Gubler DJ and Vorndam V. Rapid and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. (1992 ). 545 - 551.
26. Ministerio de Salud, Nicaragua. Boletín Epidemiológico. Semana 40 Año 2005.
27. Balmaseda et all. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. Tropical Medicine and international health. 2006.
28. Hayes John et all. Risk Factors for infection during a severe Dengue outbreak in El Salvador in 2000. Journal of Tropical Medicine 2003.
29. Yamashiro Tetsu et all. Seroprevalence of IgG specific for Dengue virus among adults and children in Santo Domingo, Dominican Republic. Journal of Tropical Medicine 2004.
30. Iturrino Monge R et all. Seroprevalence of Dengue virus antibodies in asymptomatic Costa Rican children, 2002-2003. Pan Am J Public Health 2006.
31. Siqueira Joao B. et all. Household survey of Dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. J. Trop. Med. Hyg. 2004.
32. Annelies Wilder-Smith et all. Seroepidemiology of Dengue in the adult population of Singapore. Tropical Medicine and International Health. 2004.
33. Chen WJ. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. Am. J. Trop. Med Hyg.
34. Juárez Sergio. Responsable del sistema de control de vectores. Silais León. MINSA, Nicaragua. Entrevista personal

35. Ministerio de Salud, Nicaragua. Boletín Epidemiológico. Semana 15 Año 2004.
36. Vaughn DW. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. Am J Trop Med Hyg 1999.
37. Balmaseda A. et al. Serotype specific differences in clinical manifestations of Dengue. Am J Trop Med Hyg 2006.
38. Balmaseda A et al. Assessment of the world health organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. Am J Trop Med Hyg 2005.
39. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su Prevención y Control. Publicación Científica No 548. Washington. OPS, 1995.
40. Quijano Díaz F.A. et al. Evaluación de la prueba de IgM en suero agudo para el diagnóstico del dengue en un área endémica. Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clin 2006

# ANEXOS

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

**INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO  
VOLUNTARIO**

**Estudio: Seroprevalencia y Serotipificación del virus del Dengue en el municipio de León, Nicaragua durante el período de Agosto 2006-Diciembre 2008.**

**Estimado participante o padre /tutor legal:**

Ud. y/o su niño(a) están siendo invitados a participar en un estudio para determinar la distribución de las infecciones por virus del Dengue en la población general del municipio de León. Como es de su conocimiento ésta enfermedad es muy común en nuestro medio, pudiendo presentarse en muchos casos en forma de Dengue hemorrágico o la forma más severa el síndrome de choque por Dengue. Por favor lea con mucho cuidado la hoja de información que se le brinda y coméntela con otras personas si lo estima conveniente, pregunte si no le entiende a algo o si desea más información.

***Gracias por leer la información***

**Objetivo del estudio:** Determinar la seroprevalencia y los serotipos circulantes del virus del Dengue en el municipio de León, Nicaragua.

Su participación es completamente voluntaria, si una vez que reciba la información sobre el estudio no desea participar, simplemente no lo haga sin darnos ninguna justificación.

Hacemos de su conocimiento que este estudio ha sido aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-León y se llevará a cabo conforme leyes nicaragüenses y normas internacionales para la realización de estudios en seres humanos.

Si decide ser parte del estudio, le pedimos llenar un formulario el cual contiene preguntas sencillas pero básicas para el estudio y firmar su consentimiento voluntario para la toma de una muestra sanguínea.

**Confidencialidad de los resultados:**

Todos los datos e información serán estrictamente confidenciales respetando su privacidad. Los datos serán guardados en una computadora y papel sólo para la evaluación de los mismos. Estos estarán a cargo del investigador principal (Lic. Orlando Mayorga) y se archivarán por el tiempo que sea necesario para el estudio, no serán de acceso a nadie ajeno al estudio. Con su firma nos autoriza de manera voluntaria el uso de los datos de Ud. o su hijo(a) y además declara que fue informado(a) de la naturaleza del estudio y de los objetivos de este.

**Potenciales riesgos:**

Ninguno. En muy raros casos la punción venosa puede dar lugar a un hematoma que provocará molestias transitorias en el área de la punción.

**Beneficios:**

A cada uno de las muestras de los participantes se les realizará una prueba serológica que le permitirá conocer si efectivamente alguna vez se ha infectado por cualquiera de los virus del Dengue.

**Información adicional:**

Para cualquier problema o información adicional que requiera acerca del estudio, contactar al encargado del estudio Lic. Orlando Mayorga P. Dpto. Microbiología y Parasitología, UNAN-LEON, Campus Médico. Teléfono: 311 2947

Participante No. \_\_\_\_\_

<b>Nombre del Participante</b>	<b>Fecha</b> <b>Firma</b>
<b>Nombre del Padre/Tutor</b>	<b>Fecha</b> <b>Firma</b>
<b>Nombre de la persona que llena el consentimiento</b>	<b>Fecha</b> <b>Firma</b>
<b>Investigador</b>	<b>Fecha</b> <b>Firma</b>



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNAN-LEÓN**  
**FICHA EPIDEMIOLÓGICA PROYECTO DENGUE-SEROPREVALENCIA**

**1. DATOS GENERALES:**

1.1 Silais: \_\_\_\_\_ 1.2 Municipio \_\_\_\_\_ 1.3 Unidad de Salud \_\_\_\_\_  
1.4 N° de Expediente: \_\_\_\_\_ 1.5 Cod. Vivienda: \_\_\_\_\_ 1.6 Fecha: \_\_\_\_\_

**2. DATOS PERSONALES:**

2.1 Nombres y Apellidos: \_\_\_\_\_  
2.2 Edad: \_\_\_\_\_ 2.3 Fecha de Nac.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 2.4 Sexo: F ( ) M ( )  
2.5 Ocupación: \_\_\_\_\_  
2.6 Nombre del Padre y/o Madre: \_\_\_\_\_  
2.7 Dirección: \_\_\_\_\_  
2.8 Procedencia: Urbano \_\_\_\_\_ Rural \_\_\_\_\_

**3. DATOS DE LA VIVIENDA:**

3.1 Fuente de agua: Agua potable permanente \_\_\_\_\_  
Puesto publico \_\_\_\_\_  
Pozo \_\_\_\_\_  
Río \_\_\_\_\_

**4. DATOS DE CRIADEROS DE MOSQUITOS:**

**Marque: si=(S) o no =(N)**

- a. Pilas \_\_\_\_\_
- b. Barriles \_\_\_\_\_
- c. Botellas \_\_\_\_\_
- d. Piletas \_\_\_\_\_

- e. Desechos Plásticos \_\_\_\_\_
- f. Floreros \_\_\_\_\_
- g. Maceteras \_\_\_\_\_
- h. Tinajas \_\_\_\_\_
- i. Llantas \_\_\_\_\_
- j. Chatarra \_\_\_\_\_

**5. RESULTADOS DE LABORATORIO**

ELISA IgM \_\_\_\_\_

ELISA IgG \_\_\_\_\_

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNAN-LEÓN  
FICHA EPIDEMIOLÓGICA PROYECTO DENGUE-INFECCIÓN AGUDA**

**1. DATOS GENERALES:**

1. Silais: \_\_\_\_\_ 1.2 Municipio \_\_\_\_\_ 1.3 Unidad de Salud \_\_\_\_\_  
1.4 N° de Expediente: \_\_\_\_\_ 1.5 ID Laboratorio: \_\_\_\_\_ 1.6 Fecha: \_\_\_\_\_

**2. DATOS PERSONALES:**

- 2.1 Nombres y Apellidos: \_\_\_\_\_  
2.2 Edad: \_\_\_\_\_ 2.3 Fecha de Nac.: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 2.4 Sexo: F ( ) M ( )  
2.5 Ocupación: \_\_\_\_\_  
2.6 Nombre del Padre y/o Madre: \_\_\_\_\_  
2.7 Dirección: \_\_\_\_\_  
2.8 Procedencia: Urbano \_\_\_\_\_ Rural \_\_\_\_\_

**3. DATOS CLINICOS:**

- 3.1 Fecha de inicio de los síntomas \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Marque: si= (S) no = (N) o desconocido = (D)**

**3.2. Síntomas:**

- a. Fiebre \_\_\_\_\_
- b. Cefalea \_\_\_\_\_
- c. Mialgias \_\_\_\_\_
- d. Artralgias \_\_\_\_\_
- e. Dolor retro orbital \_\_\_\_\_
- f. Dolor Abdominal \_\_\_\_\_
- g. Diarrea \_\_\_\_\_
- h. Escalofríos \_\_\_\_\_

i. Anorexia \_\_\_\_\_

### **3.3. Signos:**

a. Rash \_\_\_\_\_  
b. Epistaxis \_\_\_\_\_  
c. Petequias \_\_\_\_\_  
d. Melena \_\_\_\_\_  
e. Hematemesis \_\_\_\_\_  
f. Hemorragia vaginal \_\_\_\_\_  
g. Hematuria \_\_\_\_\_  
h. Derrame pleural \_\_\_\_\_  
i. Tos \_\_\_\_\_  
j. Piel Fría \_\_\_\_\_  
k. Ascitis \_\_\_\_\_

l. P. torniquete positivo \_\_\_\_\_  
m. PA (sistólica/diastólica) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg  
n. Frec. Cardíaca no pulso \_\_\_\_\_ /min  
ñ. Llenado capilar \_\_\_\_\_ /seg  
o. Temperatura \_\_\_\_\_ °C  
p. Frecuencia Respiratoria \_\_\_\_\_ /min  
q. Vómito \_\_\_\_\_  
r. Gingivorragia \_\_\_\_\_  
s. Hepatomegalia \_\_\_\_\_  
t. Disnea \_\_\_\_\_  
u. Ictericia \_\_\_\_\_

### **4. DATOS DE LABORATORIO**

4.1 Fecha de toma de muestra: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

4.2 Hora de toma de la muestra: \_\_\_\_\_ a.m. / p.m.

4.3 Hora de refrigeración de la muestra \_\_\_\_\_ a.m. /p.m.

### **RESULTADOS**

**ELISA IgM** \_\_\_\_\_

**ELISA IgG** \_\_\_\_\_

**RT-PCR** \_\_\_\_\_

**SEROTIPO** \_\_\_\_\_

## **ELISA Indirecto IgG Dengue**

### **Materiales:**

- Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Tubos centrífuga 1.5 ml
- Gradillas
- Cronometro
- Marcadores de punta fina y punta gruesa
- Probetas de 100 ml
- Beakers de 1000 ml
- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul
- Guantes
- Papel toalla
- Papel aluminio
- canaletas

### **Equipos:**

- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 200 ul-1000 ul
- Pipeta multicanal de 50 - 200 ul
- Lector para placas de ELISA

- Lavador de placas para ELISA
- Incubadora a 37°C

### **Procedimiento:**

1. Asegurarse que todos los reactivos estén a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
2. Remover el número requerido de microposillos del paquete completo; además de las muestras se requiere 1 para el control negativo, 1 para el control positivo y 3 para calibradores.
3. Diluir solución de lavado agregando 1 parte de concentrado de buffer de lavado a 19 partes de agua destilada. Mezclar bien.
4. Diluir controles, calibrador y muestras de pacientes agregando 1000 ul de suero de dilución a 10 ul de muestra (1/100). Mezclar bien  
**Alternativa:** A 10 ul de muestra agregar 90 ul de suero de dilución, de esta dilución tomar 20 ul y agregar nuevamente 180 ul de suero de dilución. Mezclar bien.
5. Agregar 100 ul de las muestras, controles y calibradores ya diluidos en sus respectivos microposillos.
6. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a 37°C.
7. Lavar seis veces con Buffer de lavado.
8. Agregar 100 ul de conjugado anti humano IgG HRP a cada microposillo.
9. Cubrir la placa e incubar 30 minutos a 37°C
10. Lavar seis veces con Buffer de lavado.
11. Agregar 100 ul de TMB a cada microposillo.

12. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente tomando el tiempo desde la adición al primer microposillo.
13. Agregar 100 ul de solución stop a todos los posillos en la misma secuencia y tiempo que el paso anterior. Mezclar bien.
14. Leer la absorbancia de cada posillo a 450 nm. (Estable por 30 minutos)

### **ELISA de captura IgM Dengue**

#### **Materiales:**

- Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Tubos centrífuga 1.5 ml
- Gradillas
- Cronometro
- Marcadores de punta fina y punta gruesa
- Probetas de 100 ml
- Beakers de 1000 ml
- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul
- Guantes
- Papel toalla
- Papel aluminio
- canaletas

#### **Equipos:**

- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 200 ul-1000 ul
- Pipeta multicanal de 50 - 200 ul
- Lector para placas de ELISA

- Lavador de placas para ELISA
- Incubadora a 37°C

### **Procedimiento:**

1. Asegurarse que todos los reactivos estén a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.
2. Remover el número requerido de microposillos del paquete completo; además de las muestras se requiere 1 para el control negativo, 1 para el control positivo y 3 para calibradores.
3. Diluir solución de lavado agregando 1 parte de concentrado de buffer de lavado a 19 partes de agua destilada. Mezclar bien.
4. Diluir controles, calibrador y muestras de pacientes agregando 1000 ul de suero de dilución a 10 ul de muestra (1/100). Mezclar bien  
**Alternativa:** A 10 ul de muestra agregar 90 ul de suero de dilución, de esta dilución tomar 20 ul y agregar nuevamente 180 ul de suero de dilución. Mezclar bien.
5. Agregar 100 ul de las muestras, controles y calibradores ya diluidos en sus respectivos microposillos.
6. Cubrir la placa e incubar por 1 hora a 37°C.
7. Preparar el Antígeno determinando previamente la cantidad de pocillos a utilizar en el ensayo, Diluir el Antígeno 1/250 usando diluyente de Antígeno. Se recomienda como mínimo diluir 10 ul de Antígeno en 2.5 ml de diluyente de Antígeno esta cantidad es suficiente para 10 tiras (40 pocillos)

8. Mezclar el Antígeno diluido con igual volumen de MAb Tracer en un tubo de vidrio limpio o en un vial plástico, Mezclar gentilmente la solución y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos o hasta que se requiera en el ensayo.
9. Después de la hora de incubación de la placa, lavar seis veces con Buffer de lavado.
10. Mezclar la solución de Antígeno-MAb Tracer preparada anteriormente y agregar 100 ul a cada microposillo.
11. Cubrir la placa e incubar por 1 hora a 37°C
12. Lavar seis veces con Buffer de lavado.
13. Agregar 100 ul de TMB a cada microposillo.
14. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente tomando el tiempo desde la adición al primer microposillo.
15. Agregar 100 ul de solución stop a todos los posillos en la misma secuencia y tiempo que el paso anterior. Mezclar bien.
16. Leer la absorbancia de cada posillo a 450 nm. (Estable por 30 minutos)



## **Detección de virus del Dengue mediante RT/PCR**

### **Materiales**

- Tubos de 1.5 ml estériles
- Tubos de 0.5 ml estériles
- Puntas de 200 ul a 1000 ul estériles
- Puntas de 1 ul a 200 ul estériles
- Marcador permanente
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Beakers con cloro diluido
- Recipiente con hielo
- Guantes
- Papel toalla

### **Equipos**

- Termociclador
- Microcentrifuga
- Vortex
- Pipeta automática de 1-10 ul
- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 200 ul-1000 ul

### **Extracción del ARN viral (QIAGEN)**

1. Colocar 560 de Buffer AVL en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml.
2. Añadir 140 ul de la muestra ( pacientes, control positivo, control negativo y agua)
3. Vortex por 15 seg.
4. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 min.
5. Centrifugar brevemente (short spin).
6. Añadir 560 ul de etanol (96-100%) a la muestra y vortex, centrifugue brevemente
7. Aplique cuidadosamente 630 ul de la mezcla anterior en una columna QIA amp. en un tubo de 2 ml, cierre la tapa y centrifugue a 8000 rpm por 1 min.
8. Coloque la columna en un nuevo tubo de 2 ml y descarte el anterior.
9. Abra la columna y aplique nuevamente 630 ul de la solución, centrifuga nuevamente y repita el paso anterior.
10. Abra la columna y agregue 500 ul de Buffer AW1, cierre la tapa y centrifuga nuevamente (8000 rpm) por 1 min. coloque la columna en un nuevo tubo colector.
11. Abra la columna y agregue 500 ul de Buffer AW2, cierre la tapa y centrifuga nuevamente a 14000 rpm por 3 min.

12. Coloque la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y agregue 60 ul de buffer AVE tratando de que caiga en el centro del filtro sin tocarlo con la punta. Cierre la tapa.
13. Incube a temperatura ambiente por 1 min. centrifuga nuevamente a 8000 rpm por 1 min.
14. Guardar el ARN viral a -20°C.

**Nota:** Para evitar contaminación usar material estéril y puntas con filtro, no destapándolas completamente durante el procedimiento y cambiar los guantes al menos por cada procedimiento.

### Preparación de la mezcla para PCR

En un tubo eppendorf de 1.5 ml insertado en hielo junto con los reactivos agregar por cada muestra:

Componentes	Cantidad
Buffer PCR 5 X	5 ul
Primer 6 uM D1	2.5 ul
Primer 6 uM D2	2.5 ul
dNTP	1 ul
RNase Inhibitor	0.25 ul
Agua	10.25 ul
Enzima	1 ul
Muestra	2.5 ul
Volumen Final	25 ul

Agregar la enzima en el centro de la solución y mezclar bien. Inmediatamente agregar la muestra y proceder a termociclar.

Programa PCR

		<b>40 ciclos</b>		
--	--	------------------	--	--

50°	95°	94°	50°	72°	72°	4°
30 min.	15 min.	30 seg.	30 seg.	1 min.	10 min.	∞
RT		Desnaturalización	Alineación	Elongación		

### Análisis del producto del PCR por Electroforesis

- **Equipos**
- Microcentrífuga
- Balanza
- Balanza analítica
- Microonda
- Fuente de poder
- Transiluminador de luz ultra violeta
- Cámara polaroid con filtro naranja y campana
- Vortex
- Pipetas ajustables 20 ul, 200 ul.

#### **Materiales**

- Molde para gel
- Cámara de electroforesis
- Peines para la cámara de electroforesis
- Frasco Erlenmeyer de 250 ml
- Probetas de 100 ml.
- Papel para pesar
- Cinta adhesiva

- Puntas de pipetas 1 a 200 ul
- Beaker con cloro diluido
- Marcador permanente
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Guantes
- Papel parafilms
- Lentes protectores contra luz ultra violeta

### **Preparación del gel:**

1. Pesar 0.6 gr. de agarosa y disolver en 30 ml de TBE 1X (Buffer de corrida Tris, Borato, EDTA) ( 900 ml de agua destilada con 100 ml de TBE 10X)
2. Disolver completamente en microondas hasta que la agarosa este completamente disuelta, enfriar en el chorro de agua pero no completamente.
3. Agregar 4 ul de Bromuro de etidio (10 mg/ml) (cancerigeno) y mezclar.

**Nota:** Si el gel no va usarse inmediatamente no agregar Bromuro de etidio y conservar a temperatura ambiente en frasco ámbar. Al momento de utilizarse solo seguir los pasos 2 y 3.

### **Corrida Electroforética**

1. Poner tapes alrededor de la cámara y colocar los peines.
2. Agregar aproximadamente 30 ml de gel de Agarosa. ( asegurarse que la mesa este nivelada)
3. Dejar solidificar aproximadamente 40 min. ( hasta que se vea de color blanquecino)

4. Cuando este completamente sólido quitar cuidadosamente los peines y el tape.
5. Colocar en la cámara y cubrir completamente con TBE 1X.
6. En papel parafilm colocar 2 ul de Loading 6X para cada muestra, mezclar con 10 ul de muestra.
7. Colocar cuidadosamente las muestras y controles en los posillos del gel.
8. En el último posillo colocar 5 ul de Marcador.
9. Tapar la cámara y colocar los electrodos
10. Iniciar la corrida a 100 v por 1 hora aproximadamente.
11. Sacar el gel de la cámara escurriendo el TBE con papel absorbente.
12. Observar en luz ultravioleta y tomar fotografía Polaroid.

### **Preparación de la mezcla para la segunda amplificación (Serotipificación)**

En un tubo eppendorf de 1.5 ml insertado en hielo junto con los reactivos agregar por cada muestra positiva del PCR anterior:

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer PCR 10 X	5 ul
MgCl <sub>2</sub>	4 ul
Primer 6 uM D1	6 ul
TS1( 6 uM)	4 ul
TS2( 6 uM)	8 ul
TS3( 6 uM)	4 ul
Den 4 (6 uM)	4 ul
dNTP (10 mM)	1 ul
Agua	11.25 ul
Ampli Taq gold	0.25 ul
Muestra	2.5 ul
<b>Total</b>	<b>50 ul</b>

Agregar la enzima en el centro de la solución y mezclar bien. Inmediatamente agregar la muestra y proceder a termociclar.

#### Programa PCR

40 ciclos					
95°	<b>95°</b>	<b>50°</b>	<b>72°</b>	72°	4°
10 min	<b>30 seg.</b>	<b>30 seg.</b>	<b>30 seg.</b>	10 min.	∞
	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineación</b>	<b>Elongación</b>		

Realizar una corrida Electroforética del producto para visualizar las bandas de los serotipos específicos:

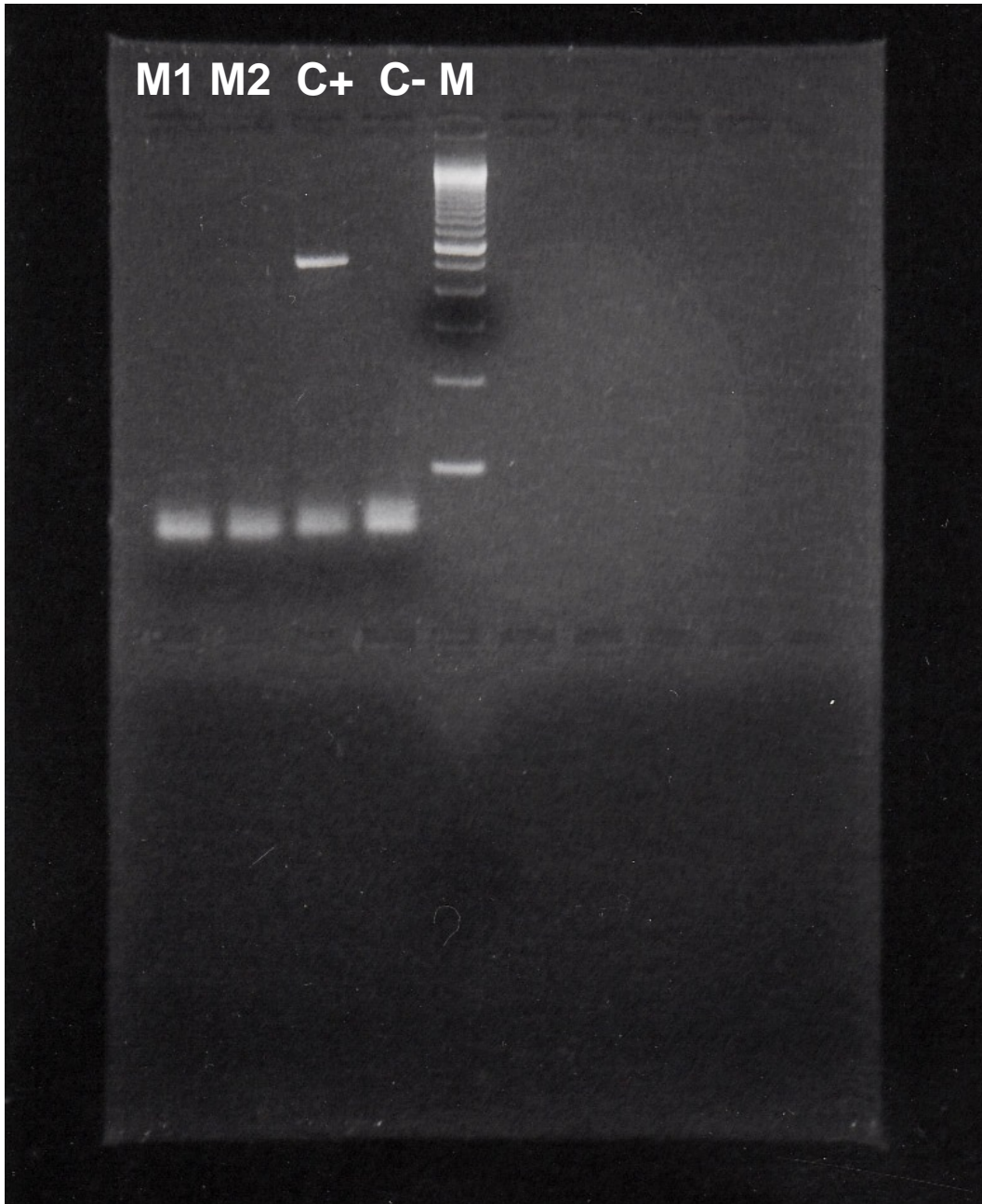
#### Cebadores empleados en la técnica de RT-PCR según Lanciotti et al.1992

Cebador	Secuencia nucleotidica	Posicion del genoma	Tamaño del producto amplificado (pb)
D1	D1: 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'	134-161	511
D2	D2: 5' – TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC 3'	616-644	511
TS1	TS1: 5'- CGT CTC AGT TGA TCC GGG GG 3'	568-586	482 (DENV-1)
TS2	TS2: 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'	232-252	119 (DENV-2)
TS3	TS3: 5'- TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3'	400-421	290 (DENV-3)
TS4	TS4: 5'- CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3'	506-527	392 (DENV-4)

## **Resultados de RT-PCR**

Primeras muestras negativas analizadas con sus respectivos controles





M1: Muestra 1

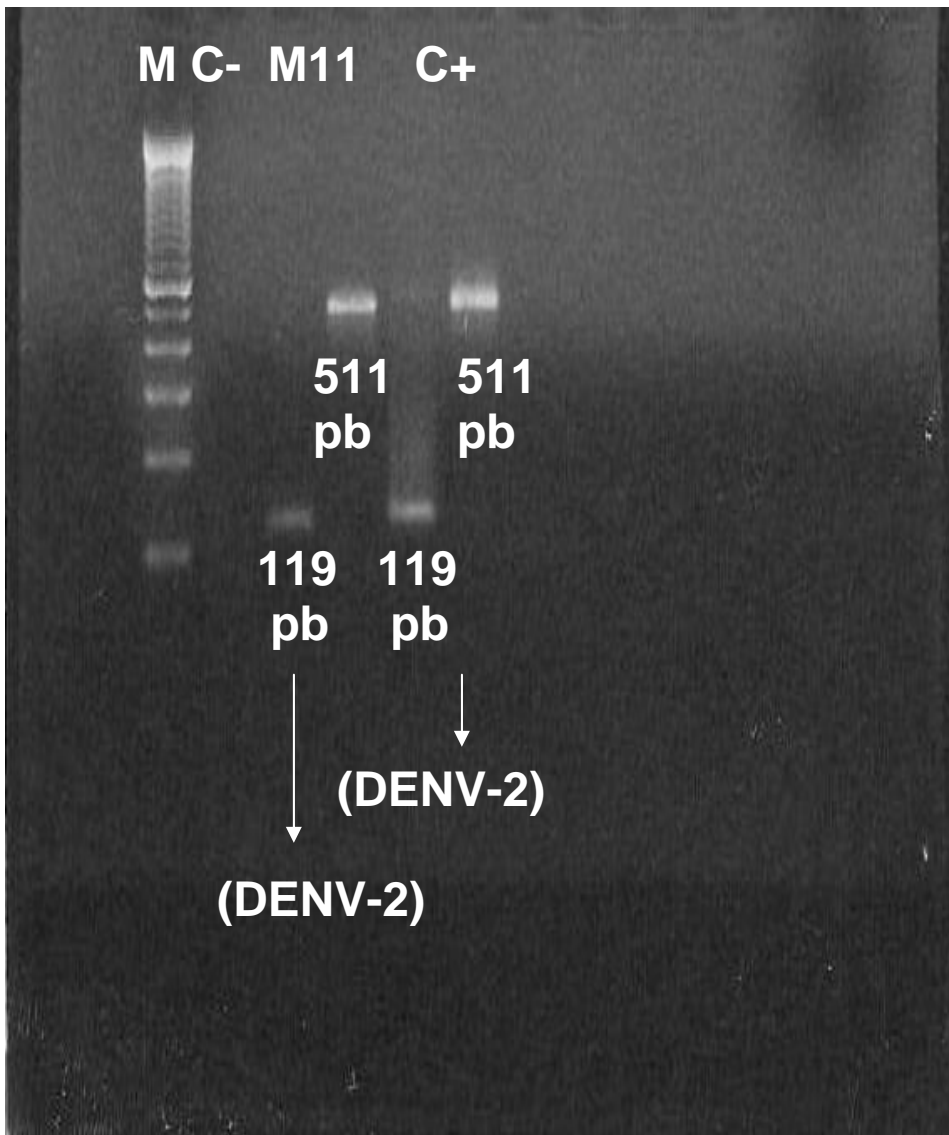
M2: Muestra 2

C+: Control Positivo

C-: Control Negativo

M: Marcador de peso molecular

Primera muestra positiva de DENV-2 y sus respectivos controles  
(RT-PCR y Nested)



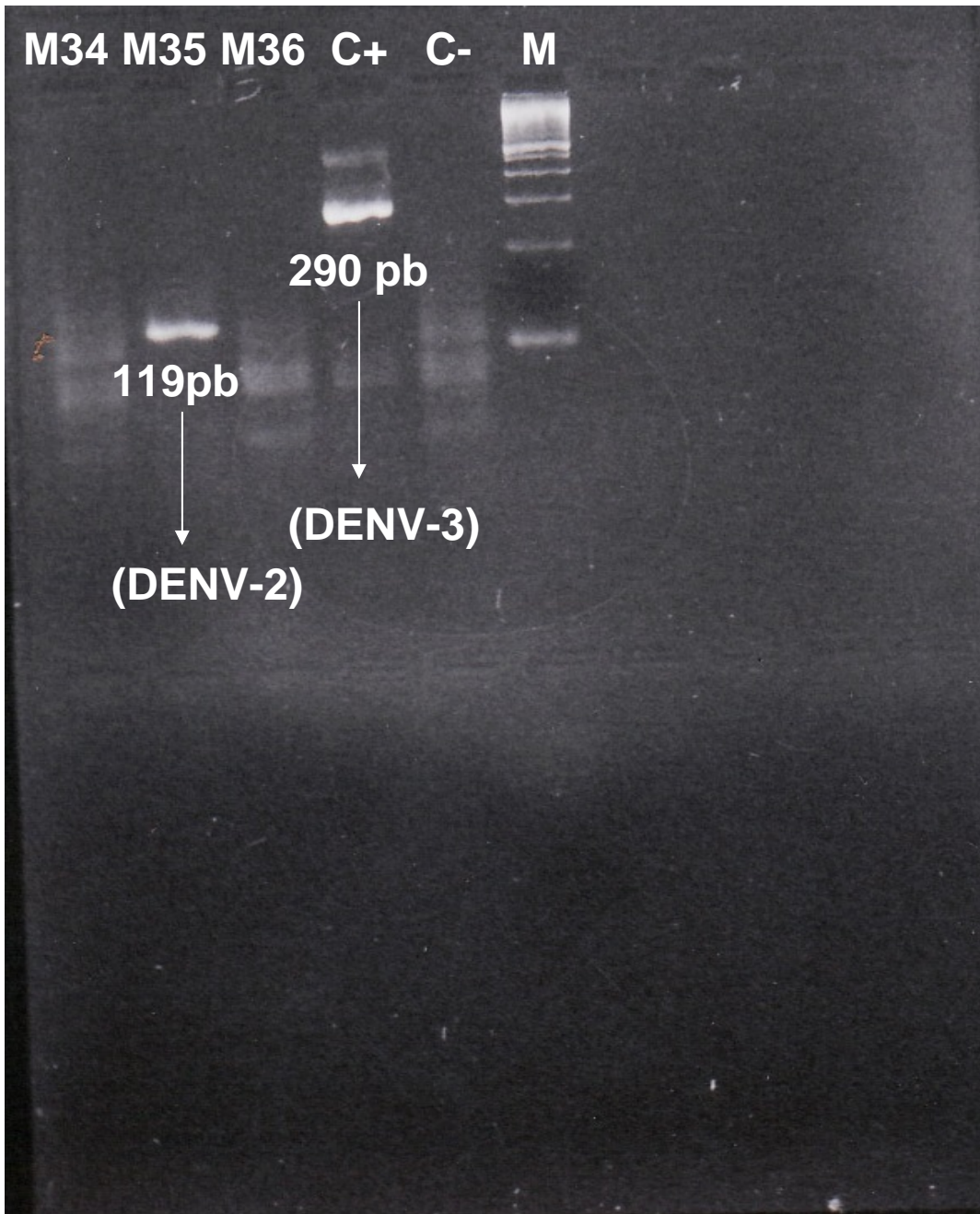
M: Marcador de peso molecular

C-: Control negativo

M11: Muestra 11

C+: Control positivo

Segunda muestra positiva de DENV-2 con sus respectivos controles (Nested)



M34: Muestra 34

M35: Muestra 35

M36: Muestra 36

C+: Control Positivo

C-: Control Negativo

M: Marcador de peso molecular

