

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**



Tesis para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico.

"Efecto de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue sobre el diagnóstico integral del dengue en pacientes hospitalizados en el HEODRA en el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010."

Autoras:

Bra. Kathya Maryourit Herrera Nissing.

Bra. Jenny Concepción Mendoza Calvo.

Tutor: Dr. Filemón Bucardo. Ph.D.

Profesor Titular.

Departamento de Microbiología y Parasitología.

¡A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD!

León, Febrero, 2012.

RESUMEN

Recientemente, se ha demostrado que la proteína no-estructural NS1 del dengue se encuentra en altas concentraciones en sangre durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. Con el objetivo de investigar el efecto que tiene la detección del antígeno viral NS1 en combinación con la detección de anticuerpos IgM anti-dengue sobre el diagnóstico integral del dengue, se analizaron 120 pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue, en el HEODRA, durante Noviembre 2009 y Octubre 2010. Los resultados revelan que el mayor porcentaje de NS1 e IgM-positivos (50%), se encontró en niños menores de 5 años y que la positividad de NS1 tiende a disminuir con la edad, pero dicha tendencia no se observa con IgM. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($OR=3.8$, $p=0.003$) entre la positividad al dengue y el género siendo la frecuencia de NS1-positivos (23%) en varones, mientras que la frecuencia de IgM-positivos fue mayor en las mujeres (37%). En este estudio el 92% de los pacientes NS1-positivos presentaron las manifestaciones típicas de la fiebre por dengue. Se encontró que efectivamente la combinación de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM incrementan el número de casos confirmados como dengue-positivo en pacientes hospitalizados, es decir, mediante la determinación de IgM solamente se hubiese identificado 27% de casos positivos con dengue, pero al sumar el análisis de NS1 incrementamos hasta 39%. En conclusión, este estudio ha extendido el conocimiento sobre el comportamiento de los marcadores de diagnósticos NS1 e IgM indicando que la combinación de ambos métodos permite ampliar la ventana de diagnóstico de la enfermedad.

DEDICATORIA

A mi Madre:

Estrella Nissing Ramírez que ha sabido corresponder como Madre y amiga guiándome en el sendero de la vida con buenos valores y principios.

A nuestro tutor:

Dr. Filemón Bucardo R., gracias por brindarnos su conocimiento para que este trabajo sea una realidad.

A mi compañera de tesis por contribuir a culminar esta meta.

Kathya Maryourit Herrera Nissing.

DEDICATORIA

A Dios Padre Celestial y nuestra Madre Santísima por darme la vida, ser guía de mis pasos con amor sabiduría, fortaleza, entendimiento, paciencia para culminar mis estudios.

A mi Madre Teresa de Mercedes Calvo Ruiz por su apoyo incondicional.

A mi Padre José Calvo Zapata por sus consejos y brindarme siempre su ayuda durante los años de vida.

A mis hermanas por su confianza en mí.

Jenny Concepción Mendoza Calvo.

AGRADECIMIENTO

A Dios Padre, creador de la tierra y los cielos, dador de sabiduría, entendimiento y amor, por permitirnos culminar nuestra tesis.

A nuestros Padres por apoyarnos en todo momento en nuestra vida y brindarnos sus buenos consejos y amor.

A nuestro tutor Dr. Filemón Bucardo Rivera por su apoyo incondicional, estímulo y confianza depositada en nosotras para la realización del estudio.

Al Dr. Samuel Vílchez por orientarnos en nuestro trabajo.

ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	2
Justificación	3
Planteamiento del problema	4
Objetivos	5
Marco teórico	6
Diseño metodológico	24
Resultados	31
Discusión	36
Conclusión	40
Recomendación	41
Bibliografía	42
Anexos	46

INTRODUCCIÓN

El Dengue es una de las enfermedades virales más importantes, anualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra 250,000–500,000 casos de Dengue Hemorrágico (DH) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) de los cuales se calcula más de 25,000 muertes.^{1,2}

El virus del dengue (VD) tiene 4 serotipos diferentes (DenV-1, DenV-2, DenV-3 y DenV-4), la infección con cualquiera de los cuatro serotipos causa un espectro de manifestaciones clínicas que van desde fiebre indiferenciada, Fiebre por Dengue Clásico, hasta manifestaciones hemorrágicas y SCD. La infección con un serotipo proporciona inmunidad permanente contra la reinfección homóloga, pero la protección contra la infección posterior por los otros tres serotipos es sólo parcial y temporal.³

El aislamiento del virus es el "Estándar de Oro" para el diagnóstico y serotipificación de infecciones del VD, pero este método requiere un tiempo prolongado y laboratorios sofisticados. Por lo tanto, el diagnóstico precoz y determinación del serotipo sigue siendo un desafío.³ El diagnóstico rápido y preciso de dengue en la fase aguda de la enfermedad se ha propuesto que involucre la detección de antígenos virales, recientemente la atención se ha centrado en la proteína no estructural 1 (NS1). Esta glicoproteína es reconocida como inmunógeno importante en infecciones por el VD, por lo tanto, NS1 recientemente se ha introducido como marcador de diagnóstico precoz.⁴

El virus del dengue pertenece a la familia Flaviviridae, es un virus envuelto, de ARN de simple cadena positiva. El ARN viral codifica 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales, incluyendo la NS1.⁵ Sin vacuna, ni terapia antiviral disponible, el abordaje adecuado del dengue dependerá en parte del uso de métodos de laboratorio que permitan la identificación temprana del agente etiológico. Este estudio pretende describir la determinación de NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue en pacientes hospitalizados, como complemento del diagnóstico integral del dengue actualmente establecido por el ministerio de salud de Nicaragua.

ANTECEDENTES

La evaluación de ensayos NS1 Dengue como herramientas de diagnóstico es una parte importante del proceso de identificación de donde estos ensayos pueden encajar en los algoritmos de diagnóstico del dengue.⁶ En Guangzhou, China en el 2006, se estudió un grupo de 313 pacientes con infección primaria durante un brote de dengue, los cuales 140 se encontraban en fase convaleciente. La determinación de NS1 presentó altos niveles en muestras de suero en fase aguda desde el primer día hasta el décimo cuarto día de la enfermedad. La sensibilidad de NS1 osciló entre 81.8% a 91.1% en muestras tomadas en los primeros siete días. Anticuerpos de IgM anti-dengue se detectaron a partir del tercer día de inicio de síntomas de dengue con una tasa de positividad de 42.9% y aumentó rápidamente al 100% al octavo día de la enfermedad. Anticuerpos anti-dengue IgG fueron detectables en el quinto día de inicio de síntomas de dengue hasta alcanzar el 100% en el décimo quinto día de la enfermedad. La combinación de los resultados de NS1 e IgM permitió un diagnóstico entre el 96.9% - 100% en muestras tomadas a partir del tercer día de iniciado los síntomas.⁷

Un estudio realizado en Francia en el 2008, comparó el uso de dos nuevas pruebas comerciales para la detección de NS1 durante la fase clínica, estas fueron inmunocromatografía y ELISA temprana (Panbio). Se analizaron 272 muestras de sueros de pacientes con diagnóstico dengue en fase aguda, y se observó que la sensibilidad de la inmunocromatografía NS1, fue de 87.4% con una especificidad del 100% y el ELISA tuvo una sensibilidad de 60.4% y especificidad del 97.9%.⁸

En el 2009 en Brasil se compararon 3 métodos para el diagnóstico precoz del dengue los cuales fueron ELISA de Panbio, Inmunocromatografía NS1 y RT-PCR, donde se analizaron 450 muestras de suero y se concluyó que la prueba inmunocromatográfica NS1 mostró en comparación con los otros 2 métodos, mayor sensibilidad para la confirmación de infecciones primarias o secundarias en la fase aguda de la enfermedad.⁹

JUSTIFICACIÓN

Debido a la ausencia de un tratamiento específico y una vacuna eficaz, el diagnóstico clínico se ha convertido en la herramienta básica para mejorar el manejo del dengue.

Con la combinación de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue se lograría incrementar el diagnóstico del dengue en pacientes hospitalizados de forma precisa y eficaz.

La importancia de la determinación de antígenos NS1, sería potencialmente útil en el ámbito clínico, vigilancia, y estudios de patogénesis de la infección por dengue y de esta manera contribuirá a la captación de casos y manejo temprano de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Podría la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue, incrementar las oportunidades del diagnóstico integral del dengue en pacientes hospitalizados en el HEODRA, estudiados durante el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010?

OBJETIVOS

GENERAL:

Describir el efecto de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue sobre el diagnóstico integral del dengue en pacientes hospitalizados en el HEODRA, durante el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010.

ESPECÍFICOS:

1. Describir las características clínicas y epidemiológicas de la población de estudio y su relación con la positividad a NS1 e IgM.
2. Investigar la frecuencia del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue en pacientes hospitalizados con sospecha de dengue.
3. Correlacionar la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue con la presencia de antígenos NS1 del virus del dengue.

MARCO TEÓRICO

El vector

El *Aedes aegypti* es el más importante de los mosquitos vectores transmisor del virus dengue por hábitos peri-domiciliar. Esta especie se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, hasta los 40 grados de latitud norte y sur del ecuador.^{1,2}



Este insecto doméstico se cría y vive en la vivienda humana o sus alrededores, puede ser trasladado por los medios de transporte que utiliza el hombre, sean terrestres, marítimo o aéreo. Se desarrollan en los más diversos recipientes, en los que el agua se conserve por períodos superiores a una semana, sin renovarla totalmente: tinas o barricadas, latas, floreros, neumáticos de autos desechados, retretes sin uso, cisternas, piletas, etc. Sin embargo también se lo han encontrado en los huecos de los árboles y cáscaras de huevos. En condiciones favorables, las larvas completan su desarrollo en unos 10 días, de acuerdo con la temperatura ambiental. Disminuyendo en el invierno, pero en las regiones tropicales, se reproducen durante todo el año y las generaciones se suceden ininterrumpidas.¹²

Solamente la hembra es hematófaga y cuando pican es en ese momento cuando transmiten el virus de la enfermedad, (los mosquitos infectados con el VD, permanecen así de por vida), pican por lo común al atardecer, aunque pueden hacerlo a cualquier hora, pero generalmente lo hacen a primera hora del día de 5 am a 9 am de la mañana y al final de la tarde de 3 pm a 7 pm. Cuando pican lo hacen en las piernas, tobillos y otras partes del cuerpo que estén descubiertas. De este modo se produce una gran abundancia de *A. aegypti* durante todo el año y se observan 3 a 4 adultos hembra por persona por hora especialmente durante épocas secas, cuando normalmente la evaporación excede la precipitación. La postura de los huevos es

parcial y repetida, por lo cual una sola hembra puede originar varios focos.¹³ Existen otras especies de *Aedes* importantes por su transmisión de diferentes virosis o por constituir plagas graves en el hombre o animales domésticos: *A. vexans*, *A. dorsalis*, *A. nigromaculis*, *A. sollicitans*, *A. scapularis*, *A. albopictus*, etc.¹²

El ambiente físico donde se los encuentra depende de: latitud, altitud, temperatura y humedad: *Latitud*: 40 grados de latitud norte y sur del ecuador sobrepasando estos límites, durante las estaciones de calor, pero no sobreviven los inviernos muy fríos. *Altitud*: se encuentran hasta los 2200 m sobre el nivel del mar. *Temperatura*: entre 15° y 40°. *Humedad*: necesita lugares húmedos, tropicales y agua para desarrollarse y llegar al estado adulto.³⁷

La lucha contra el mosquito vector, es actualmente la única opción, que disponemos para reducir la incidencia de la enfermedad, tanto en sus formas benigna como severas.¹⁵ La resistencia de *Aedes* sp, contra el DDT (**D**icloro **D**ifenil **T**ricloroetano) apareció en los años 60 y desde esa época los insecticidas órgano-fosforados (Fenthion, Malathion, Fenitrothion) comenzaron a ser utilizados en el control de *Aedes aegypti*. Otros métodos de lucha anti-mosquito incluyen la utilización de larvicidas como *Bacillus thuringiensis* H-14 y otros.¹⁴ El tiempo que vive el adulto del *A. aegypti*, desde el punto de vista práctico, se puede decir que todos los mosquitos nacidos de un determinado foco desaparecen en un período de 5 semanas después de la eliminación de dicho foco.¹³

El riesgo para la transmisión del VD es predominantemente urbano y se relaciona con altas densidades en las poblaciones tanto de mosquitos como de seres humanos. Este fenómeno se ha intensificado en los últimos años por la agudización de los problemas de orden público en el campo. Originando la migración de enormes masas de campesinos hacia las concentraciones urbanas en busca de seguridad y alimento, fomentando aún más los cinturones de miseria en las ciudades y con ellos el incremento de mosquitos transmisores del dengue. La falta de suministros adecuados de agua potable que obliga su almacenamiento en recipientes generalmente destapados y la falta de recolección de basura que incluye llantas, botellas, tarros, que son los principales determinantes de la multiplicación de los vectores.^{16,18}

El virus

Taxonomía del virus del dengue. El dengue es una enfermedad, provocada por el virus del mismo nombre, que pertenece a:

Familia: *Flaviviridae*

Género: *Flavivirus*

Especie: *Dengue*

Genómica y factores de virulencia.

El virión maduro tiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside, la proteína M, asociada a la membrana y la proteína E de la envoltura ^(Figura 1, 2) y otras proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Todas estas proteínas se forman a partir de una gran poliproteína (5' C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'), para la cual codifica el genoma del virus. El genoma del virus está constituido por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena única y aproximadamente 11 kilobases (kb) y alta variabilidad genómica. Tiene un coeficiente de sedimentación de 42S y un peso molecular de 4.2 Kd. El ARN genómico es de polaridad positiva y funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación. Presenta una caperuza tipo I, con una estructura Gppp Amp cubriendo el extremo 5' terminal, seguido por una secuencia dinucleotídica conservada AG. El extremo 3' terminal carece de cola poliadenilada y termina con una secuencia dinucleotídica conservada CU. Los ácidos nucleicos genómicos, por sí mismos, son infecciosos, por lo que las autoridades de salud recomiendan manejar este virus en el nivel de bioseguridad 2. ¹

El genoma contiene un único marco de lectura abierto (MLA) de más de 10,000 bases, flanqueado por las regiones no codificantes (RNC) en ambos extremos (3' y 5'), que codifica para un precursor polipeptídico, que por sucesivos cortes proteolíticos, genera la formación de las 10 proteínas virales a través de un procesamiento co y postraduccional. El orden de las diferentes regiones del gen en el virus es el siguiente: 5'NTR-CprM (M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'.NTR. La ruptura de las uniones C-prM, prM-E, E-NS1, y NS4A-NS4B es realizada por la enzima señalasa retículo endoplásmica. ¹

Figura 1.- Virus del Dengue.

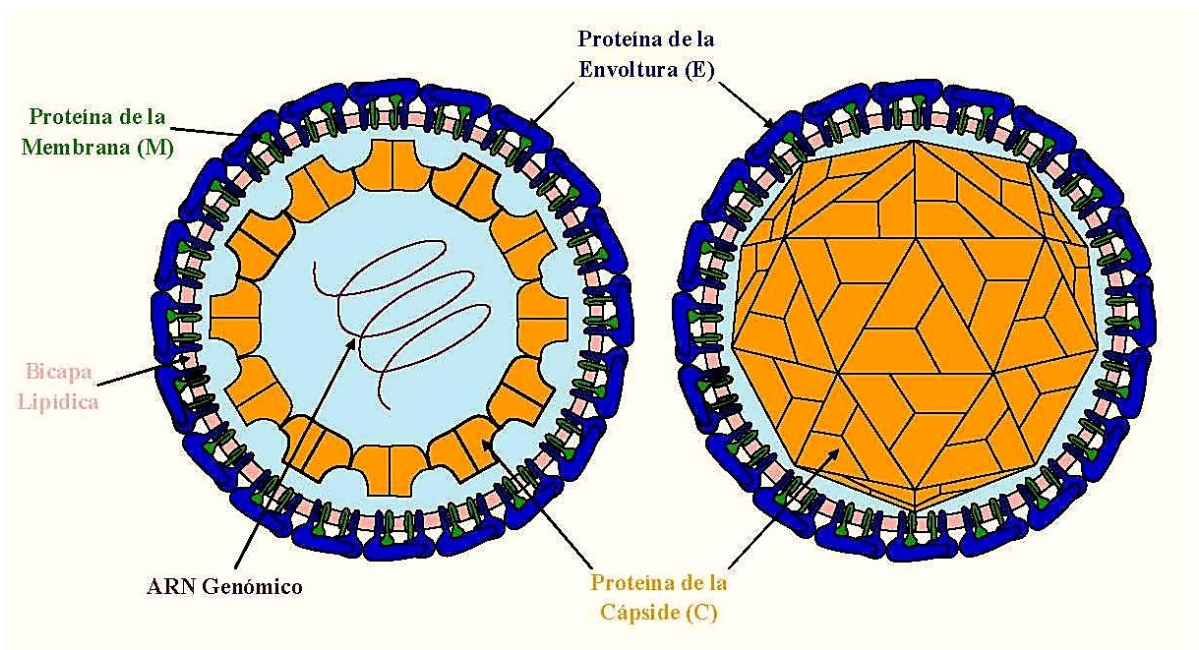
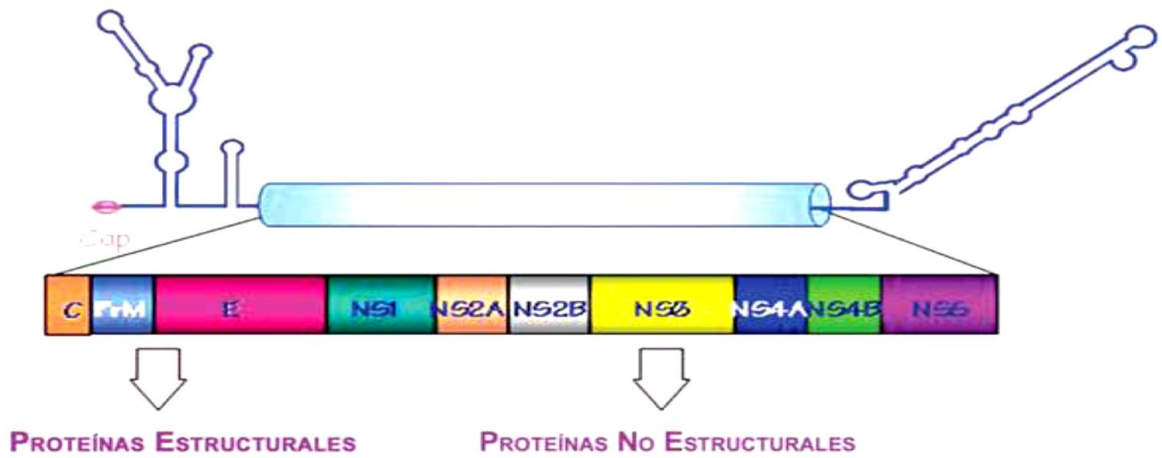


Figura 2.- Organización del genoma viral del Dengue.



Proteínas virales estructurales.

El virión maduro contiene 3 proteínas estructurales: **C**, proteína de la nucleocápside o núcleo; **M**, proteína asociada a la membrana y **E**, proteína de la envoltura. Los virus inmaduros contienen una proteína conocida por prM; que es un precursor de M.

La proteína **C** es componente básico de la nucleocápside, el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción, tiene un peso molecular de 13.5 kd. Es rica en residuos de lisina y arginina los que le confieren un carácter altamente básico que permite su interacción con el ARN viral, con el que forma la nucleocápside como componente estructural.

La **prM** (22 kb) es el precursor glicosilado de la proteína estructural M (8 kb). La separación proteolítica de este precursor por una proteasa del aparato de Golgi durante la maduración viral, es lo que da origen a la formación de la proteína M. Esta escisión parece estar ligada a la liberación del virus, pero no ocurre necesariamente en todas las moléculas proteicas presentes en la membrana viral, ya que en ocasiones aparece la proteína M junto a la prM en el virión maduro. Anticuerpos contra prM pudieran mediar inmunidad de tipo protectora, quizás por la neutralización de los viriones liberados que contienen prM no cortada. Existe en 2 formas, dependiendo de la maduración del virus: *Proteína pre-M (prM)*, Célula-asociada o viriones inmaduros, glicosilada. Heterodimeriza con proteína E, esencial para el propio plegamiento de E. *La proteína M madura*, es una proteína de membrana, extracelular o de virus maduros, resultado de la proteólisis de prM y eliminación de la porción amino terminal, C-terminal no-glicosilado, asociada estrechamente a la envoltura lipídica. La formación de M a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral. Hasta el presente el papel de M en el virión no es bien conocido.¹

La proteína **E**, es una glicoproteína con un peso molecular entre 51-60 kd, es la mayoritaria de la envoltura, glicosilada y la más conservada, la fusión con la célula huésped es inducida por pH bajo. Están estrechamente asociadas a la envoltura lipídica. Se presenta como un homodímero en la superficie del virión maduro e intracelularmente se puede encontrar como un heterodímero junto a la proteína prM en forma de prM-E. Es el componente principal de las

proyecciones de la superficie del virión observadas por microscopía electrónica y contiene los determinantes antigénicos responsables de la neutralización del virus y la hemaglutinación de eritrocitos de ganso, induciendo respuesta inmunológica en el huésped infectado. Los determinantes de la proteína E están también involucrados en la unión de los viriones a los receptores celulares y probablemente juegan un papel importante en la fusión intraendosomal a pH bajo. Se ha propuesto que en ella están localizados la mayoría de los marcadores moleculares para la patogenicidad. La comparación de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína E de los diferentes flavivirus ha mostrado una conservación perfecta de los 12 residuos de la cisteína, los cuales forman 6 puentes disulfuro. El modelo estructural para la proteína E fue refinado por Mandl y colaboradores, quienes correlacionaron las propiedades estructurales de diferentes epítomos con los puentes disulfuro.¹

Proteínas no estructurales.

Las siete proteínas virales no estructurales (NS) fueron identificadas y se confeccionaron mapas del ARN viral deducido por la secuencia aminoacídica. La primera proteína no estructural NS1, contiene 2 señales del tipo Asn-X Ser/Thr, usada para la adición de carbohidratos, estos sitios parecen estar conservados en todos los flavivirus. Puede estar en forma secretada y no secretada. Es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como una proteína monomérica y en un período corto se une formando un homodímero. Esta forma es más hidrofóbica y se desconoce si el incremento de la hidrofobicidad es un resultado de la dimerización o alguna modificación postraduccional. Una vez formado este dímero, la glicoproteína es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones pasando a la superficie celular, liberándose en el medio extracelular; Estudios de mutagénesis en la región C terminal de NS1, han demostrado que esta región es importante en la estabilidad y la secreción del dímero.¹

La proteína NS1 es una glicoproteína aproximadamente de 48-50 kd. (353 o 354 aminoácidos) que tiene un alto contenido de aminoácidos y homología nucleotídica entre Flavivirus. NS1 no forma parte del virión pero se libera de las células infectadas por virus del dengue. Estudios preliminares han demostrado que esta glicoproteína posee entidades que participan en la replicación viral del ARN, y se ha encontrado en muestras de sangre de la fase

aguda de pacientes con infecciones de virus del dengue primario o secundario. Esto ha sugerido una posible participación importante de NS1 en patogénesis de virus del dengue y su posible uso como marcador apropiado para la infección por el virus del dengue. La célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo una diana de la citólisis inmunológica, resultando interesante su uso potencial en la protección del hombre contra la infección por flavivirus.¹⁷

La proteína NS1 porta 2 ó 3 sitios de glicosilación en las especies virales, induce inmunidad protectora y además, aporta epítomos específicos de grupo y de tipo. En los virus de la encefalitis transmitida por garrapata las dos formas de la NS1 están asociadas a secuencias parciales de NS2a. Se tiene el consenso que la NS1 induce inmunidad y que la inmunogenicidad es verdaderamente dependiente de la estructura conformacional de la molécula. La forma dimérica es más antigénica que la forma monomérica, pero se ha observado que es destruida por el calor. Las enzimas y los pH ácidos que solamente participan en la reducción de puentes de disulfuro. Los anticuerpos inducidos por esta proteína son esencialmente líticos en presencia del complemento y dan la posibilidad de retardar la infección viral en los tejidos. Por el contrario, la estimulación de las células T citotóxicas no ha podido ser demostrada hasta el presente. Huang y colaboradores en 1999 demostraron un reconocimiento cercano al 45 % por anticuerpos de pacientes a un péptido sintético de los 15 primeros aminoácidos de la proteína correspondientes a una región inmunodominante de la NS1. Durante un estudio dinámico, se pudo constatar que a los dos días del comienzo de los síntomas en una infección secundaria, es posible detectar anticuerpos contra este péptido.³¹

En un trabajo publicado por García y colaboradores en 1997, se observó el reconocimiento por parte de sueros de pacientes con infección primaria y secundaria a cinco péptidos de la proteína no estructural NS1 y un péptido de NS3, lo que sugiere que estos epítomos se encuentran expuestos durante la infección natural por dengue.¹ La NS3 es la segunda proteína en tamaño, con un peso molecular entre 68 y 70 kd, asociada a la membrana. Es altamente conservada en los Flavivirus y se piensa que sea un componente de la maquinaria enzimática de la replicación del ARN viral. La comparación de sus secuencias nucleotídica y los análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, conteniendo actividad de proteasa (contra la

poliproteína), de helicasa y de ARN trifosfatasa trifosfato (formación de la estructura 5' cap.) Su extremo N terminal contiene el dominio catalítico de la proteasa NS2b-NS3, parecido a la serina-proteasa de las subfamilias de las tripsinas. Esta triada catalítica está conformada por His 51, Asp 75 y Ser 135. Se cree que la actividad proteolítica de esta enzima sea la responsable del corte de NS2b, NS3, NS4a, NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C. En esta proteína existen regiones homólogas con la familia de las helicasas, así como un fragmento C terminal de 50 kd derivado de la proteólisis, que tiene actividad ARN trifosfatasa y está involucrado en la formación de la estructura de la caperuza del extremo 5' del genoma del flavivirus.

Las regiones hidrofóbicas menos conservadas de la poliproteína son procesadas en al menos 4 proteínas no estructurales adicionales (NS2a, NS2b, NS4a y NS4b). Poco se conoce de las funciones de estas en el ciclo de vida de los flavivirus. Sin embargo, se conoce que la NS2b, de 27 kd, junto con la NS3 forma un complejo esencial para el procesamiento de todos los sitios de corte de las proteínas no estructurales y las estructurales. La última proteína codificada es la NS5, que es la más grande de 103 a 104 kd, bifuncional y una de las más conservadas en los flavivirus. Es una proteína básica y se cree que funciona como una ARN polimerasa dependiente del ARN, aunque no se ha verificado directamente. Esto se basa en la presencia de una región altamente conservada (YF NS5 666-668) característica de este tipo de enzima presente en los virus ARN con cadena positiva. Se ha sugerido que puede estar involucrada en la metilación de la estructura de la caperuza 5' terminal.¹

En los últimos años, se han realizado estudios en pacientes con infección primaria y secundaria por dengue para definir las proteínas involucradas en el reconocimiento por anticuerpos. En pacientes con infección primaria en fase de convalecencia y bajos títulos de anticuerpos IgG a la proteína E, existe reconocimiento a NS3 y NS5. En pacientes con infección secundaria, en fase de aguda, se encontraron anticuerpos IgG contra la proteína E y en fase convaleciente, altos títulos de anticuerpos IgG a otras proteínas, incluidas la NS1, NS3, NS5 y C. Los anticuerpos contra las proteínas E, NS3 y NS5 pueden ser detectados a los 5 días de la aparición de los síntomas. Estas tres proteínas y los anticuerpos contra ellas pueden estar involucradas en los mecanismos inmunopatogénicos de esta enfermedad. La confirmación de

esta enfermedad podría basarse en la identificación de anticuerpos contra estas proteínas no estructurales. En la mayoría de los casos con infección secundaria, en fase convaleciente, se observan anticuerpos contra las proteínas no estructurales NS3 y NS5, y en cerca del 40 % contra la proteína NS1.¹

Serotipos del virus.

El dengue es un Arbovirus ocasionado por cualquiera de los cuatro serotipos diferentes del virus (Denv-1, Denv-2, Denv-3 y Denv-4), estrechamente relacionados, pero serológicamente distintos. Dentro de cada serotipo hay varias cepas y genotipos, que probablemente son más o menos virulentas, pero los factores de virulencia no son totalmente conocidos. Por ejemplo el Denv-2 presenta 2 genotipos (el sudeste asiático y el americano) el primero asociado al dengue hemorrágico y el segundo al dengue benigno. Cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo serotipo (homólogo), de por vida. Y aunque son antigénicamente similares, la infección por un serotipo, no produce inmunidad contra los otros serotipos, sólo produce inmunidad parcial, o sea, no proveen inmunidad cruzada. Los cuatro serotipos son capaces de producir infección inespecífica, enfermedad febril y cuadros graves que pueden conducir hasta la muerte, dada la variación genética en cada uno de los cuatro serotipos. Algunas variantes genéticas parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico^{17,19}

La divergencia entre virus del mismo serotipo se detectó comparando secuencias completas o parciales de los genes que codifican para las proteínas E o NS1. De esta manera, los virus DEN-1 y DEN-2 se han agrupado en 5 subtipos,² DEN-3 en 4³ y DEN-4 en 2 subtipos.⁴ Otros métodos diferentes a la secuenciación nucleotídica se han usado para genotipificar virus dengue, entre estos, la amplificación simultánea de secuencias reconocidas por endonucleasas de restricción o (RSS-PCR).^(5,6) La técnica permite identificar homología o divergencia genética entre aislados comparando el patrón electroforético de los fragmentos amplificados. Así, los virus DEN-1 se agrupan en 3 subtipos (A-C), DEN-2 en 7 (A - G), DEN-3 en 3 (A - C) y DEN-4 en 2 (A y B). En cada subtipo RSS-PCR se agrupan aislados de localidades y años de aislamientos similares, que corresponden a uno de los subtipos generados por secuenciación nucleotídica o más.¹

Varios estudios han demostrado que la frecuencia de casos hemorrágicos durante una epidemia de dengue depende de la cepa del virus, por lo tanto, el monitoreo de la distribución temporal de serotipos y subtipos en áreas endémicas provee información del riesgo de FHD. El DEN-2 es el serotipo que con mayor frecuencia produce casos severos seguido por el DEN-3, DEN-1 y DEN-4, los virus DEN-2 subtipo III y DEN-3 subtipo III son los que más se aíslan de casos severos.¹¹

Replicación-transmisión (Figura 3).

La patobiología de los *Flavivirus* ha sido revisada por varios autores el primer foco de infección en el hospedero, después de la inoculación del virus por el vector, es la piel. Desde allí, la infección se disemina a los nódulos linfáticos regionales, dando lugar a la viremia primaria. La progenie viral es vertida hacia el plasma y toma diferentes órganos, en dependencia de la afinidad por los tejidos. El virus dengue parece tener mayor afinidad por las células del sistema fagocito-mononuclear. El ciclo de transmisión del virus del dengue por el mosquito *Aedes aegypti* comienza con una persona infectada con el dengue, que tendrá el virus circulando en la sangre (viremia que dura aproximadamente cinco días). El virus es inoculado en los seres humanos con la saliva del *Aedes aegypti* hembra, este se localiza y se replica en diversos órganos diana, por ejemplo, nódulos linfáticos locales e hígado. Posteriormente se libera y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos, de ahí son liberados y circula en la sangre. El mosquito ingiere sangre que contiene el virus.¹⁹

El ciclo que se detalla a continuación es el “probable” ciclo de multiplicación del VD, ya que aún se carece de información sobre el mecanismo de varias etapas del proceso. El paso inicial en la entrada del VD ha sido dividido en adsorción y penetración, la adsorción es un proceso independiente de la temperatura que ocurre a 40°C como a 37°C, mientras que la penetración viral continúa solo a 37°C. Cabe destacar que la infección viral se lleva a cabo dentro de las dos horas siguientes a la adsorción.

1. Adsorción: Involucra la adhesión a receptores específicos de la superficie celular. Comienza con la unión de la glicoproteína E con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la penetración de la partícula viral que conduce al desnudamiento y

liberación del genoma viral en el citoplasma. *Receptores celulares*; incluyen tanto proteínas como glicosaminoglicanos (GAGs), se encuentran proteínas susceptibles a tripsina, el receptor de alta afinidad para laminina, el receptor de manosa, proteínas de shock térmico, la proteína asociada al antígeno de diferenciación mieloide CD14 y la proteína regulada por glucosa. El VD infecta los monocitos humanos a través de un mecanismo que implica tanto receptores proteicos como receptores Fc resistentes a la tripsina. Los principales blancos para el VD en humanos son las células del sistema monocítico-macrofágico, linfocitos B y células de la médula ósea. Los mastocitos son además blancos potenciales para la infección por VD en vista a su expresión de receptores Fc.

2. Penetración del Virus Dengue a las células: Después de la unión a la célula huésped los virus envueltos utilizan dos principales vías de penetración. El mecanismo de penetración y desnudamiento de los virus envueltos queda aún por esclarecer, mientras algunos grupos de investigación sostienen que el ingreso se da por fusión directa entre la envoltura viral y la membrana plasmática otros sugieren que la endocitosis es la vía elegida. El mecanismo de entrada del VD a las células independiente de la presencia de anticuerpos involucra la unión de la glicoproteína E del DENV a la membrana celular. Está generalmente aceptado que para una infección productiva, la entrada viral de los flavivirus se produciría a través de endocitosis mediada por receptor. La adhesión del virus y la subsiguiente entrada es impulsada por los cambios conformacionales en la proteína E.

3. Entrada del virus en una infección secuencial heterotípica. En este caso el mecanismo de entrada del VD a la célula huésped involucraría la unión de complejos virus-anticuerpo a células que contengan receptores Fc mediante la porción Fc de la inmunoglobulina G. En presencia de cantidades sub-neutralizantes de anticuerpos, los receptores Fc pueden mediar la adhesión y captación del VD al interior de las células blanco. La infección secuencial heterotípica aumentaría el riesgo de desarrollar DHF o síndrome de shock por dengue (DSS) a través de un proceso inmunológico conocido como respuesta aumentada mediada por anticuerpos (ADE), con formación de complejos inmunes entre el virus y los anticuerpos heterólogos no neutralizantes que permitirían un aumento de la infección de células monocíticas a través de la unión a receptores para el fragmento Fc del anticuerpo.³²

Figura 3. Replicación-transmisión

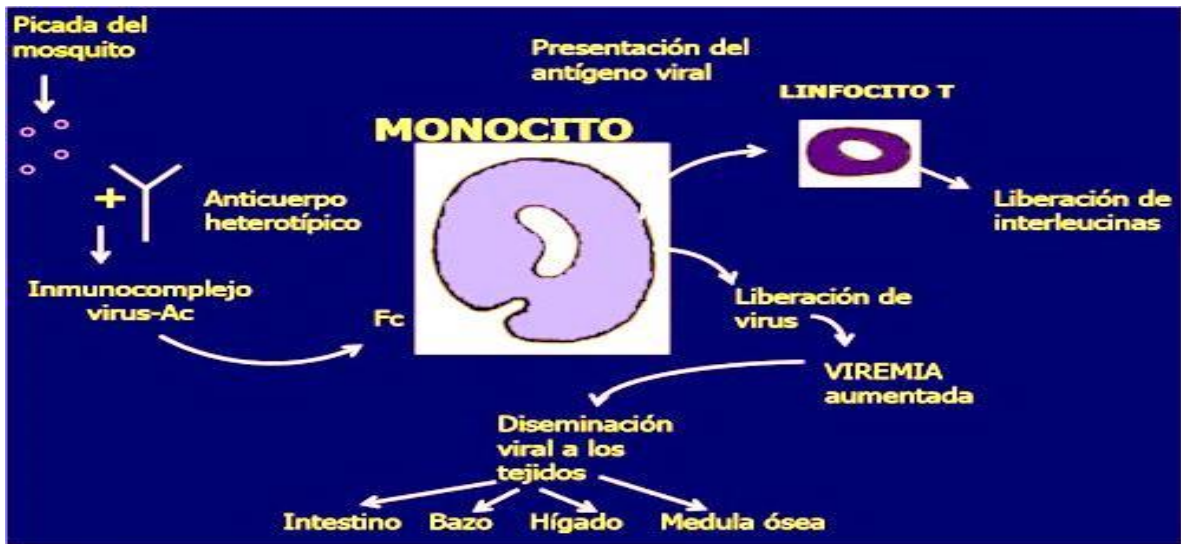
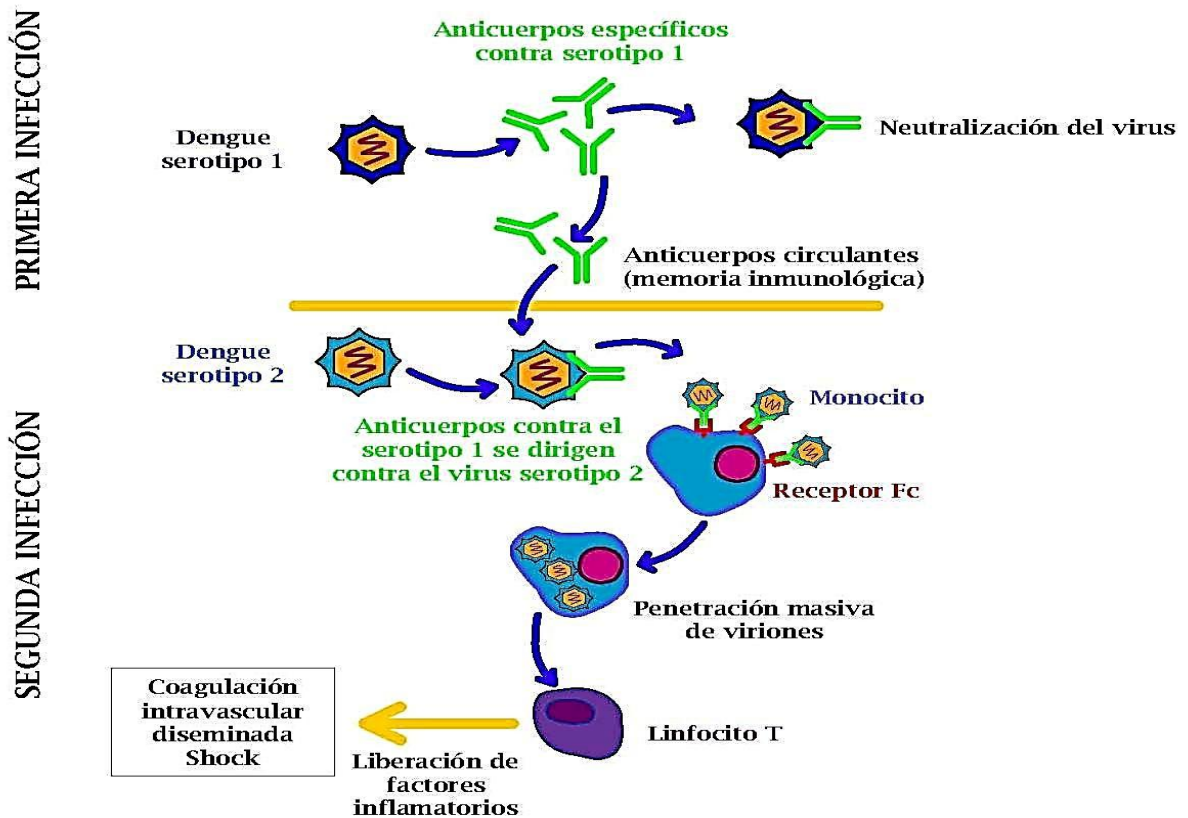


Figura 4. Mecanismo inmunopatológico, ante la infección de los serotipos de dengue.



Inmunopatogenia (Figura 4). El mecanismo inmunopatológico que se desarrolla ante la infección de los serotipos de dengue; no se conoce con exactitud, pero se han desarrollado modelos hipotéticos para tratar de explicar por qué un paciente puede desarrollar FDH o quedarse en la fiebre por dengue (FD).^{11,36}

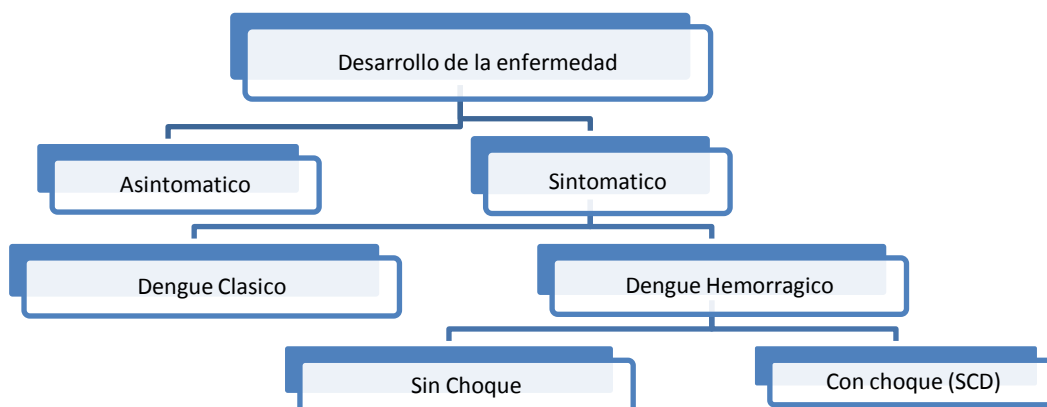
Las dos teorías más aceptadas son: **1ra:** si un caso ha sido infectado en una primera infección por un serotipo, especialmente el Dengue 1, queda protegido contra ese serotipo, pero no contra los otros serotipos y, al contrario, en una infección secundaria o terciaria, los anticuerpos de la primera infección, facilitan la ayuda de estos segundos virus infectantes hacia los monocitos, donde se multiplicarán en gran cantidad, empobreciendo la membrana celular, lo que ocasiona salida de sustancias vasoactivas como: bradiquina, histamina, sustancias activadoras del complemento, citoquinas y otras, que llevan al aumento de la fragilidad capilar lo que ocasiona salida del plasma del espacio intravascular al extravascular, produciéndose los derrames pleurales, abdominales, articulares y en cualquier otro espacio del organismo. Esto lleva a la depleción del volumen sanguíneo y, como consecuencia, se desarrolla el SCD. También se activan las sustancias que estimulan la aparición de la coagulación intravascular diseminada (CID) lo que agrava el síndrome de choque. Se incluyen, los menores de 1 año de edad con infección primaria nacidos de una madre portadora con experiencia inmunológica con dengue, los cuales portan anticuerpos transferidos por vía transplacentaria^{5,11}.

2da: Hay serotipos de virus muy agresivos cuya virulencia se potencia en los pases sucesivos del mosquito al hombre y del hombre al mosquito, ocasionando formas severas de FHD y de SSD que pueden llevar a la muerte en la primera infección que sufra una persona, tras un ataque temprano de dengue se forman anticuerpos que son específicos para ese serotipo.

En una infección posterior por un serotipo diferente los anticuerpos se unen al virus, pero no solo consiguen neutralizarlo (como podría esperarse de un subtipo diferente) sino que aumenta su capacidad para infectar a los monocitos. La porción Fc de la inmunoglobulina unida al virus se une a los receptores para el Fc de los monocitos y la entrada en la célula por esta vía aumenta la eficacia de la infección. La infección de un número creciente de monocitos

aumenta la liberación de citocinas a la circulación y esto provoca una lesión vascular, el shock y la hemorragia especialmente en el tracto gastrointestinal y la piel. Se forman anticuerpos “potenciadores” similares en otras muchas infecciones víricas, pero solo en la fiebre hemorrágica del dengue desempeñan un papel patogénico.²⁰

El Dengue se presenta en 3 formas clínicas:



1. Dengue clásico (FD):

El dengue clásico es el más frecuente. Se caracteriza por la presencia de fiebre de más de 39° C, y puede estar acompañada de uno o más de los siguientes signos o síntomas:

Cefalea

Dolor retro-orbital

Dolor ósteo-muscular

Exantema

Manifestaciones hemorrágicas (con prueba del torniquete: POSITIVA). La fiebre persiste por uno a dos días, y luego desciende, pero puede subir nuevamente con menor intensidad al cabo de dos días. Estos síntomas pueden durar entre 5 a 8 días.^{21, 22, 23}

2. Fiebre hemorrágica por dengue (FHD)

Afecta a pacientes previamente infectados con el virus del dengue principalmente a pacientes en la edad infantil y en ocasiones adultos. Es una enfermedad febril aguda que se caracteriza por disminución de la cuenta de plaquetas y hemoconcentración en pacientes infectados con uno de los cuatro serotipos de virus del dengue. Los defectos de la permeabilidad capilar y de la coagulación originan manifestaciones hemorrágicas y en los casos más graves choque hipovolémico (SCD), con mortalidad de 40-50% en pacientes en choques no tratados. Los síntomas iniciales son indistinguibles de los del dengue clásico, pero las manifestaciones

hemorrágicas evolucionan rápidamente. Son leves en la mayoría de los casos (prueba del torniquete positiva, petequias, epistaxis), pudiendo llegar a manifestaciones hemorrágicas en piel, tubo digestivo, sistema nervioso, aparato urinario, o datos de serositis, con derrame pleural y/o ascitis. En los casos leves o moderados, luego del descenso de la fiebre, el resto de los síntomas y signos desaparecen. Generalmente los pacientes se recuperan espontáneamente o luego de la terapia de reposición hidroelectrolítica y gradualmente solo necesitan tratamiento con paracetamol.^{21, 24, 25,26}

En los casos graves, rápidamente o después de un descenso de la fiebre entre el 3er y el 7mo día, el estado del paciente empeora repentinamente, presentándose cianosis, taquipnea, hipotensión, hepatomegalia, con o sin manifestaciones hemorrágicas y falla circulatoria. La situación es de corta duración, pudiendo llevar a la muerte en 12 a 24 horas (1-10% de los casos) o a la rápida recuperación luego del tratamiento anti-choque. Existe un aumento de la permeabilidad vascular, hemoconcentración, trombocitopenia, y depleción del fibrinógeno (del factor VIII y del, factor XII) con concentración elevada de sus productos de degradación. Hay ascenso del tiempo de protrombina, tromboplastina y trombina. La albúmina sérica está disminuida, y se presentan albuminuria y leve ascenso de TGO y TGP. El edema, la extravasación sanguínea, la necrosis e infiltración leucocitaria mononuclear también son complicaciones de la fiebre hemorrágica por dengue.^{21, 27, 28}

3. Síndrome de Choque por Dengue (SCD): Se caracteriza por manifestaciones de dengue hemorrágico, se agrega, pulso débil y acelerado, disminución de la presión del pulso, hipertensión, desvanecimientos, respiración difícil, extremidades húmedas y frías (el tronco suele estar caliente), palidez, inquietud, insomnio, dolor de estómago intenso y continuo, vómitos frecuentes, cianosis en torno a la boca, hemorragias nasales, bucales o gingivales y equimosis cutáneas. Es común la hepatomegalia, bronconeumonía, eventualmente con derrames pleurales bilaterales. Puede haber miocarditis. El estado del enfermo se va deteriorando progresivamente, hay tendencias hemorrágicas, en forma de púrpura, petequias o equimosis en los puntos de inyección; a veces hematemesis, melena o epistaxis. Se produce el choque a los 2 a 6 días de enfermedad, con colapso súbito o postración, requiriendo

tratamiento hospitalario, ya que el sistema circulatorio del paciente se ve muy comprometido y pone en riesgo su vida.²³

Factores de riesgo para el dengue hemorrágico:

1. Cepas del virus y anticuerpos anti-dengue pre-existente.
2. Edad.
3. Anticuerpos maternos en menores de un año.
4. Factores genéticos del huésped.
5. Infección previa e infecciones secundarias.
6. Mayor riesgo en localidades con dos o más serotipos en circulación simultánea a altos niveles (transmisión hiper-endémica).²⁹

Factores sociales:

1. Densidad de la población.
2. Viviendas inadecuadas.
3. Períodos inactivos en la casa durante el día.
4. Abastecimiento de agua, discontinuo, y agua almacenada.
5. Estado socioeconómico y eliminación de los desechos inadecuados.

Factores del vector

1. Abundancias y focos de proliferación de mosquitos.
2. Edad de las hembras y frecuencia de la alimentación.
3. Disponibilidad de huéspedes y la susceptibilidad innata a la infección³⁰

Factores para la evolución clínica del dengue:

1. Choque duradero (>de 1 hora) y choque recurrente.
2. Choque refractario.
3. Insuficiencia respiratoria.
4. Leucocitosis en ausencia de infección bacteriana secundaria.
5. Ser portador de enfermedades crónicas (diabetes, asma, cardiopatías, etc.).³¹

DIAGNÓSTICO

La amenaza del Dengue no se debe, ni se puede enfrentar aisladamente en las actuales condiciones mundiales. Los países centroamericanos deben actuar conjuntamente y de manera coordinada para solucionar este problema. Dado que los síntomas de infecciones de VD son suficientemente específicos para la diferenciación clínica de enfermedad febril y fiebre hemorrágica, el diagnóstico definitivo, se basa en aislamiento viral, serología y detección de RNA. El aislamiento del virus es el "estándar de oro" para el diagnóstico y serotipificación de infecciones de VD, pero este método es lento y requiere laboratorios sofisticados. La detección de virus de ácido nucleico normalmente proporciona un diagnóstico más sensible y rápido que el método de aislamiento viral tradicional. Sin embargo, diagnósticos moleculares, tales como la transcriptasa inversa (RT-PCR), requieren experimentados técnicos y especializados equipos de laboratorios. Aunque la detección de anticuerpos con ensayos basados en el antígeno los inmunoensayo enzimáticos (ELISA) son usados comúnmente, las limitaciones de este ensayo son reactividad cruzada con los serotipos de DV, así como otros miembros de la familia Flaviviridae, especialmente en los casos de infección secundaria. Por lo tanto, el diagnóstico precoz y la determinación del serotipo sigue siendo un desafío, ya que depende principalmente de métodos de aislamiento del virus o RT-PCR.

Como alternativa, se ha propuesto la detección de antígenos virales, y más recientemente la atención se ha centrado en proteínas no estructurales 1 (NS1), esta glicoproteína no forma parte del virión pero se libera de las células infectadas por virus del dengue participando en la replicación viral de RNA.

Esta glicoproteína ha sido altamente conservada y expresada en las formas asociadas de membrana o secretadas. Posee no sólo grupos específicos, sino, también determinantes específicos del tipo y ha sido reconocido como inmunógeno importante en infecciones de DV. Por lo tanto, NS1 podría utilizarse como un marcador de diagnóstico precoz, posee una sensibilidad del 92.8% y especificidad es entre 98.4% los falsos positivos son consideradamente raros.^{33, 35,36}

Los ensayos de captura de anticuerpos IgM anti-dengue (MAC-ELISA) es el más comúnmente usado para el diagnóstico de rutina, las pruebas serológicas del dengue son más difíciles, porque los anticuerpos del dengue producen reacción cruzada con otros flavivirus como: Virus del Nilo Occidental (VNO), Virus de la encefalitis de San Luis (VESL), Virus de la Encefalitis Japonesa (VEJ) y Virus de la Fiebre Amarilla (VFA). Además, la respuesta de anticuerpos IgM varía considerablemente entre las personas debido a la respuesta inmune humoral. Los ensayos de antígenos NS1 tienen muchas ventajas sobre ensayos de RT-PCR incluyendo la rapidez, la comodidad y la rentabilidad, NS1 se ha demostrado que es detectable desde el primer día de los síntomas y en la primera fase convaleciente tras la aparición de la enfermedad.^{33,34}

La detección basada en ELISA de antígenos virales y anticuerpos específicos tienen la ventaja de ser más fáciles de realizar y estandarizar, siendo especialmente adecuado para los países endémicos donde el agente es muy frecuente. En consecuencia, estos procedimientos pueden convertirse en métodos de rutina para el diagnóstico de infección de dengue. Un entendimiento de los perfiles cinéticos del dengue NS1, así como del dengue IgM y respuestas de anticuerpos IgG ayudará a aclarar las ventajas y desventajas de estas pruebas para el diagnóstico de infección de dengue.³⁴

La detección de antígenos del dengue en el suero de la fase aguda era hasta hace poco inusual en casos de infecciones secundarias, debido a que dichos pacientes tenían complejos inmunitarios preexistentes de anticuerpos IgG del virus. Avances en ELISA y técnicas de hibridación en punto mancha dirigidos al antígeno de la envoltura y membrana y la proteína 1 no estructural (NS1), demostraron que se pueden detectar altas concentraciones de estos antígenos en forma de complejos inmunitarios tanto en casos de infección primaria como en secundaria, hasta nueve días después de la aparición de la enfermedad. La NS1 produce una respuesta humoral muy fuerte. Muchos estudios han estado dirigidos a detectar la NS1 para hacer un diagnóstico temprano de infección por el virus del dengue, aunque no distinguen entre los serotipos del dengue. Su rendimiento y utilidad están siendo actualmente evaluados por diferentes laboratorios a escala mundial, incluyendo la red de laboratorios de WHO/TDR/PDVI.³⁶

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio: Descriptivo de corte transversal.

Área de estudio: Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA), de la ciudad de León, en el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010.

Población: Pacientes febriles con diagnóstico clínico de dengue, según criterios de la OMS, hospitalizados en el HEODRA en la ciudad de León, durante el período de Noviembre 2009 a Octubre del 2010.

Muestra: Integrada por 120 muestras de plasma de pacientes hospitalizados en el HEODRA, durante el período de estudio Noviembre 2009 a Octubre 2010, seleccionadas de manera aleatoria y por conveniencia.

Criterios de inclusión:

1. Paciente febril con sospecha de dengue según los criterios de la OMS.
2. Que el paciente haya sido muestreado durante la etapa aguda o convaleciente.
3. Muestras de plasmas de los pacientes en el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010.
4. Que haya aceptado participar en el estudio antepuesta su firma en el consentimiento informado.

Fuente: Primaria.

Instrumento de recolección de datos:

El instrumento de recolección de datos contenía preguntas sobre aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio de cada paciente, cuya información recopilada fue reflejada en la ficha de estudio (Anexo1).

Análisis y almacenamiento de las muestras:

La toma de la muestra se realizó a partir de las muestras del estudio clínico del dengue, donde se tomaron 100 uL de plasma, los cuales fueron transportados, almacenados y conservados a temperatura de 2°-8°C en el Departamento de Microbiología y Parasitología del

Campus Médico UNAN-LEÓN, hasta el día de su procesamiento. Para el análisis de las muestras se determinó la presencia de antígenos NS1 utilizando la prueba inmunocromatográfica SD Dengue NS1 Ag (Standar Diagnostic) y serología ELISA de captura en la determinación de anticuerpos IgM anti-dengue (MAC-ELISA, Panbio). Las lecturas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro Human Reader Plus, con longitud de onda de 450 nm con filtro de referencia de 600-650 nm.

Determinación del antígeno viral NS1

Descripción del Kit SD Dengue NS1 Ag: El procedimiento se realizó tal como lo describe la técnica que trae consigo el Kit. La prueba rápida inmunocromatográfica SD Dengue NS1 Ag, está diseñada para detectar el antígeno viral NS1 del Dengue en suero, plasma o sangre total, durante la fase clínica de la enfermedad y el tipo de determinación es cualitativa. La prueba contiene una tira de membrana la cual es preparada con anti-dengue NS1 Ag de captura en la región de la banda determinada para el test. El anti-dengue NS1 Ag es conjugado con oro coloidal, la muestra al ser colocada en el puerto de entrada del test se va desplazando a través de la membrana cromatográfica la cual se visualiza en la línea en la región del test y otra en la región del control de la prueba detectando el complejo antígeno-anticuerpo-antígeno con partículas de oro. El Kit debe estar a temperatura ambiente y cada una de las pruebas, deben estar en su empaque hasta el momento de su uso.

Procedimientos:

1. Remover el empaque que contiene a la prueba inmunocromatográfica.
2. Colocar tres gotas de la muestra (plasma, suero y sangre total) en el puerto de entrada del dispositivo de la prueba inmunocromatográfica.
3. Dejar reaccionar aproximadamente de 15 a 20 minutos y así observar el resultado a través de la ventana del dispositivo.

Interpretación:

1. Se debe observar una línea púrpura en la región del control de la prueba. Si la muestra es positiva se observa una línea púrpura en la zona del control de la prueba y otra línea púrpura en la zona del test.

2. Si solo se observa una línea en la zona de control la muestra es negativa. De observarse solamente la línea en la zona del test y no en la zona control la prueba es inválida y se repite.

Limitaciones del test: Un resultado falso negativo puede ocurrir por la baja cantidad del virus en la muestra.

Determinación de anticuerpos IgM anti-dengue.

Método de elección para la vigilancia seroepidemiológico del dengue, es el inmunoensayo enzimático sobre la fase sólida de captura para IgM (MAC ELISA) anti-dengue. Este método es específico, sensible, económico, sencillo y de relativa rapidez que determina infección aguda, pero no permite identificar los serotipos circulantes.

Principio del ensayo:

Los anticuerpos en suero de la clase IgM, cuando están presentes, se combinan con los anticuerpos anti-IgM humana con los que está recubierta la superficie de poliestireno de las tiras de micropocillos de prueba (placa de ensayo). Se diluye al volumen correcto de trabajo con diluyente para antígenos un conjunto de antígenos recombinantes de dengue concentrados de los serotipos 1-4. Los antígenos se producen utilizando un sistema de expresión en células de insecto y se inmunopurifican utilizando un anticuerpo monoclonal específico. Al antígeno diluido se le agrega un volumen equivalente de peróxidasa de rábano (HRP) y anticuerpos monoclonales conjugados (MAb), permitiendo la formación de complejos antígeno-MAb. Se desecha el suero residual de la placa de ensayo mediante lavados y se agregan complejos antígeno-MAb a la placa de ensayo. Entonces, estos complejos antígeno-MAb se unen a los anticuerpos IgM específicos contra dengue del suero. Después de la incubación, los micropocillos se lavan y se añade un sistema de sustrato incoloro, tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno (Cromógeno TMB). La HRP hidroliza el sustrato, si está presente y el cromógeno cambia a color azul. Después de interrumpir la reacción con ácido, la TMB cambia a amarillo. El cambio de color indica la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue en las muestras ensayadas (Anexo 2).

Procedimientos:

Nota: Comprobar que todos los reactivos se han estabilizado a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo. Si se realiza el ensayo fuera de los intervalos de tiempo y temperatura que se indican, se pueden obtener resultados no válidos. Deberán repetirse todos los ensayos que no estén comprendidos en los tiempos e intervalos de temperatura establecidos.

Pre-dilución suero:

1. Extraer el número necesario de micropocillos de la bolsa de aluminio e insertarlos en el soporte de tiras. Se necesitan cinco pocillos para el Control Negativo (N), Control Reactivo (R) y el Calibrador (CAL) por triplicado. Comprobar que el resto de los micropocillos no utilizados se guarden en la bolsa de aluminio bien sellada.
2. Uso de tubos adecuados de ensayo o una placa de microtitulación, se diluye y el Control positivo, Control negativo, el Calibrador y muestras de los pacientes:
 - 2.1 Añadir 1000 ul de diluyente de la muestra a 10 ul de suero. Mezclar. Alternativa.
 - 2.2 Añadir 90 ul de diluyente de la muestra a 10 ul de suero. Tomar 20 ul de suero diluido y añadirlo a 180 ul de diluyente de la muestra. Mezclar

Procedimiento de ELISA:

Antígeno:

1. Determinar el número necesario para su análisis. Diluir 1/250 de antígeno con el diluyente de antígeno. Se recomienda, como mínimo, diluir 10 ul de antígeno en 2.5 mL de diluyente de antígeno. Esto es suficiente para un máximo de 5 tiras (40 pozos). Es necesario un volumen de 0.5 ml de antígeno diluido por tira. Una vez que se tiene el antígeno se añade el antígeno diluyente de la solución y se convierte en un color azul pálido. Asegurarse de que el resto de Ag concentrado no utilizado se mantenga a 2-8°C.
2. Extraer el volumen requerido de antígeno diluido y mezclar con un volumen igual de trazador MAb, en un vial limpio de plástico o de vidrio. Mezclar suavemente la solución de antígeno y trazador MAb (solución marcador) y dejar a temperatura ambiente (20-25°C) hasta su utilización. (Incubar por 60 minutos). Deseche la parte no utilizada que diluye al antígeno.

3. A los 10 min, después de mezclar el trazador MAb y antígeno diluido. Pipetear 100 ul del diluido de las muestras de pacientes y controles en sus respectivos micropocillos de la placa de ensayo.
4. Cubrir la placa e incubar durante 1 hr a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
5. Lávese seis (6) veces con tampón de lavado diluido. (Consulte el procedimiento de lavado).
6. Mezclar el antígeno MAb solución marcador antes de transferirlo. Pipetear 100 uL de antígeno-MAb complejos, desde el vial de antígeno a los pocillos correspondientes de la placa de ensayo.
7. Cubrir la placa e incubar durante 1 hr a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
8. Lavar seis (6) veces con tampón de lavado diluido. (Procedimiento de lavado).
9. Pipetear 100 ul de TMB en cada pozo.
10. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$). A partir del momento de la primera adicción un color azul se desarrollará.
11. Pipetear 100 ul de solución de parada o de Stop en los pocillos en la misma secuencia y tiempo como la adición de TMB. Mezclar bien. El color azul cambiará a amarillo.
12. Dentro de 30 minutos, leer absorbancia de cada pocillo en longitud de onda de 450nm, con un filtro de referencia de 600-650 nm.

Nota: La lectura de los micropocillos a 450 nm sin un filtro de referencia pueden resultar valores superiores de absorbancia debido a fondo.

Lavado: El lavado es eficaz para eliminar de las muestras residuos, es requisito fundamental en el procedimiento de ELISA.

1. Lavadora automática de placas. (No aplica).
2. Lavado Manual:
 - 2.1 Desechar el contenido de la placa en un recipiente apropiado para desechos.
 - 2.2 Llenar los pocillos con tampón de lavado (350 ul por cada pozo) utilizando un frasco adecuado. Evitar la propagación del tampón de lavado, ya que puede reducir el lavado eficiente y deséchelo de inmediato.
 - 2.3 Vuelva a llenar los pozos con tampón de lavado y desechar inmediatamente.
 - 2.4 Repita el paso (3) 4 veces más. Esto hará un total de 6 lavados con tampón de lavado.

2.5 Después del lavado final, deseche el contenido de los pozos e invierta la placa sobre una toalla de papel absorbente para asegurar que todo el tampón de lavado es eliminado.

Interpretación de los resultados:

El dengue IgM de captura determina el nivel de anticuerpos IgM contra dengue en sueros de pacientes. Un resultado positivo (>1 unidades PANBIO) es indicativo de un activo de dengue infección primaria o secundaria. Si la diferenciación entre la infección primaria y secundaria es necesaria, el Dengue Dúo (E-DEN01D) ELISA debe ser utilizado.

ÍNDEX	PANBIO UNIDADES	RESULTADO
<0,9	<9	Negativo
0,9 a 1,1	9 a 11	Equívoco
> 1.1	> 11	Positivo

Negativo: No hay anticuerpos IgM. El resultado no descarta la infección del dengue. Adicionales la muestra debe ser probado en 7-14 días, si hay sospecha de infección. Otros ensayos del dengue se deben realizar para descartar una infección aguda.

Positivo: Presencia de anticuerpos IgM. Otros ensayos serológicos para dengue se deben de realizar para confirmar la infección del dengue.

Limitaciones de la prueba:

1. Los resultados de este método no son diagnóstico por si solos y deberán valorarse junto con las manifestaciones clínicas de la enfermedad presentada por el paciente.
2. Estudios sero-epidemiológicos en la población pueden variar con el tiempo en diferentes regiones geográficas.
3. El valor predictivo positivo depende de la probabilidad de que el virus este presente. Las pruebas sólo se deben llevar a cabo en pacientes con síntomas clínicos o cuando la exposición se sospecha.
4. La reactividad cruzada serológica cruzada a través del grupo flavivirus es común (entre serotipos 1, 2, 3, 4 dengue, Encefalitis del Valle de Murray, Encefalitis Japonesa,

Fiebre Amarilla y el Virus del Oeste del Nilo). Estas enfermedades deben excluirse antes de la confirmación del diagnóstico.

5. Anticuerpos heterófilos son una causa bien conocida de interferencias en los inmunoensayos. Estos Acs de animales IgG dan reacción cruzada con anticuerpos reactivos y generan una señal falsa positiva. Debe de excluirse antes de la confirmación del diagnóstico.
6. Este ensayo emplea proteínas expresadas en insectos. La reactividad cruzada o la interferencia de los Acs anti-insectos es desconocido con los resultados del ensayo.
7. Todo suero que demuestre un resultado positivo en la prueba por el PANBIO Dengue IgM ELISA de captura, debe ser referido a un laboratorio de referencia para la confirmación de la positividad y registro epidemiológico. Se utiliza IgM de captura igual que el método ELISA IgM e IgG determinados en sueros diluidos

Plan de análisis: Se realizó a través de una base de datos creada en el Programa SPSS versión 14.0 en el que se introdujeron las variables de estudio, donde los resultados fueron presentados en tablas y gráficos.

Aspectos éticos:

1. Los datos que identificaban al paciente se mantuvieron bajo estricta confidencialidad, anterior el consentimiento informado.
2. Los pacientes incluidos no recibieron remuneración económica alguna.
3. Se utilizaron códigos identificadores previamente establecidos para cada ficha recolectora de datos.
4. Todos los materiales y documentación del estudio se mantuvieron en un lugar seguro y restringido solo para colaboradores del mismo.
5. En el estudio se incluyeron personas de diferentes sexos, raza, religión o partido político.
6. Los resultados obtenidos fueron utilizados sólo para fines del estudio.

RESULTADOS

Características epidemiológicas. En los 120 pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico de dengue, en el período Noviembre 2009 a Octubre 2010 en el HEODRA, la edad promedio fue de 22 años, la mayoría de los casos investigados estaban entre 16 y 30 años (41%) y el género predominante fue el femenino (56%). El 60% de los casos fueron del área rural y la mayoría eran estudiantes (50%) seguidos por amas de casas (36%). De los 120 pacientes analizados, 47 (39%) fueron diagnosticados con clínica y laboratorio como dengue-positivo. La edad promedio de los dengue-positivos fue de 19 años. El grupo etáreo de 6 a 15 años 51%, (OR= 2.1, p = 0.08) y el sexo femenino 48%, (OR= 3.8, p= 0.003), y del total de 8 niños menores de 5 años el 50% (n=4) correspondieron a casos dengue positivo por NS1 los cuales fueron significativamente los más afectados (Tabla. 1).

TABLA 1. Relación entre la presencia de la proteína NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue en diferentes grupos etáreos y sexo.

Variable	NS1-positivo ^a (%)	IgM-positivo ^b (%)	Dengue Positivo ^c (%)
Edad			
0-5 años (n=8)	4 (50) ^a	3 (38) ^b	4 (50)
6-15 años (n=37)	12 (32)	9 (24)	19 (51) ^c
16-30 años (n= 49)	5 (10)	13 (27)	16 (33)
31 a más (n= 26)	3 (12)	7 (27)	8 (31)
Total	24 (20)	32 (27)	47 (39)
Sexo^d			
Femenino (n=67)	12 (18)	25 (37)	32 (48) ^d
Masculino (n=53)	12 (23)	7 (13)	15 (28)

Fuente: Ficha de recolección de datos.

^a NS1-positivo vs grupos de edades, (OR= 4.6, p = 0.007); ^b IgM-positivo vs grupos de edades, (OR= 0.845, p = 0.892); ^c Dengue-positivo vs grupos de edades, (OR= 2.1, p = 0.08); ^d Dengue-positivo vs género (OR= 3.8, p = 0.003).

TABLA 2. Presencia del antígeno viral NS1-positivo e IgM-positivo y su relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad del dengue.

Variable	Frecuencia n=120(%)	NS1-positivo n=24(%)	IgM-positivo n=32(%)
Fiebre	120 (100)	24 (100)	32 (100)
Cefalea	118 (98)	23 (96)	32 (100)
Mialgia	117 (98)	22 (92)	31 (97)
Dolor Retroorbital	119 (99)	24 (100)	32 (100)
Dolor abdominal	80 (67)	14 (58)	24 (73)
Vómito	57 (48)	12 (50)	16 (48)
Prueba de Torniquete	46 (40)	11 (46)	14 (42)
Rash	39 (33)	10 (42)	15 (45)
Diarrea	34 (28)	4 (17)	7 (21)
Petequias	18 (15)	4 (17)	4 (12)
Gingivorragia	8 (7)	3 (13)	5 (15)
Hematemesis	2(2)	0	0
Sangrado vaginal	2 (2)	0	1 (3)
Hematuria	2 (2)	0	0
Artralgia	1 (1)	0	1 (3)
Melenas	0	0	0

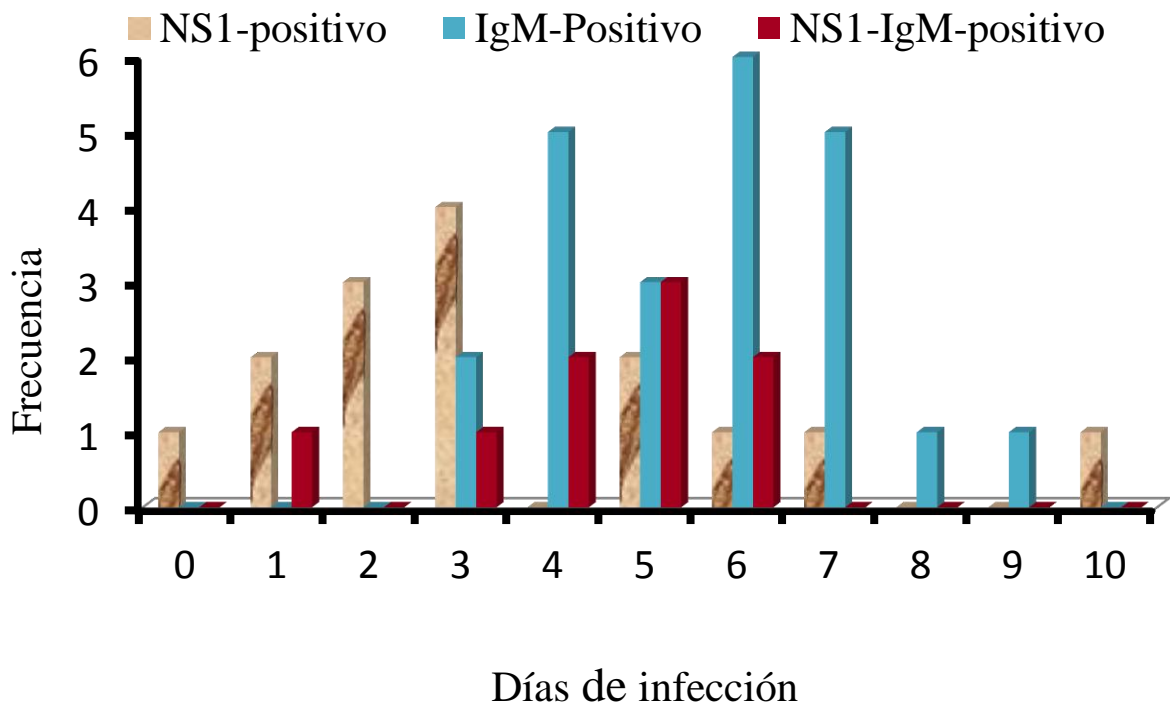
Fuente: Ficha de recolección de datos.

Características clínicas. El $\geq 98.0\%$ de los pacientes estudiados presentaron fiebre, cefalea, mialgia y dolor retro-orbital. Se observó dolor abdominal, vómito y diarrea en 67 %, 48 % y 28%, respectivamente. Un 40% fueron positivos a la prueba del torniquete, se observó rash y petequias en 33% y 15%, respectivamente. Otras manifestaciones hemorrágicas como: gingivorragia, hematemesis, sangrado vaginal y hematuria se presentaron en menores proporciones ($< 7\%$). Se observó $\geq 92\%$ de la presencia del antígeno viral NS1 con las manifestaciones clínicas de dengue como fiebre, cefalea, mialgia, y dolor retro orbital, un 58%, 50% y 17%, en dolor abdominal, vómito y diarrea, un 46% a la prueba de torniquete fue positiva, rash en 42% y otras manifestaciones hemorrágicas en una menor proporción. Con

respecto a la positividad de IgM se observó muy buena correlación $\geq 97\%$, con las manifestaciones clínicas fiebre, cefalea, mialgias y dolor retro-orbital, un 44% de positividad a la prueba de torniquete, 47% rash, 50%, y 75% vómito y dolor abdominal, y las manifestaciones hemorrágicas se presentaron en proporciones mínimas (Tabla 2).

Relación entre días de infección y presencia del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue. Un total de 24 (20%) muestras de 120 analizadas presentaron el antígeno viral NS1 y la mayoría de estas (92%) tenían ≤ 6 días de infección. Un total de 32 (27%) muestras analizadas presentaron anticuerpos IgM anti-dengue y la mayoría (88%) de esos casos tenían ≥ 4 días de infección. Un porcentaje importante (8%), tenían el antígeno viral NS1 y anticuerpos anti-dengue (IgM), esta característica se presentó en pacientes con ≥ 3 días de infección (Fig.1). Un paciente fue declarado positivo al dengue si presentaba al menos uno de los dos marcadores de diagnóstico investigados en este estudio. La frecuencia de dengue-positivo observada en este estudio fue de 39% (47/120) (Tabla. 1)

Fig. 1.



Correlación entre la presencia del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM según edad:

Este estudio revela que ambos marcadores de diagnóstico pueden encontrarse en un mismo paciente. La información que se manifiesta es que a medida que aumenta la edad disminuye la proporción de casos positivos a NS1 siendo más afectados los niños menores de 5 años (OR= 4.6, $p = 0.007$), pero dicho efecto no se observó cuando se analizó la IgM (Fig. 2). Otro hallazgo interesante es que las mujeres resultaron mayormente positivas a IgM (37% vs 13%) no observándose así en la detección de NS1.

Fig. 2. Presencia del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue en relación a la edad en pacientes hospitalizados en el HEODRA, Noviembre 2009 – Octubre 2010.

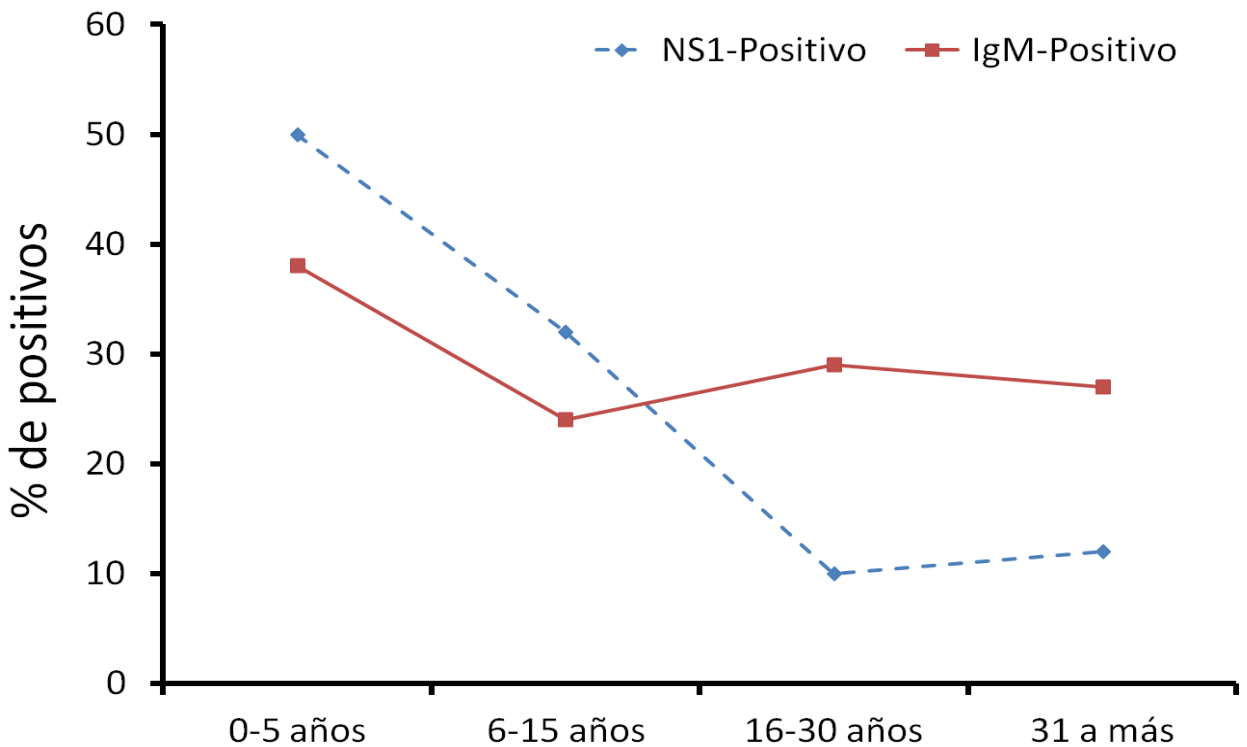


TABLA 3. Correlación entre presencia del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM en pacientes hospitalizados en el HEODRA durante el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010

Variable		IgM		
		Positivo	Negativo	Total
NS1	Positivo	9 (8%)	15 (13%)	24 (20%)
	Negativo	23 (19%)	73 (61%)	96 (80%)
	Total	32 (27 %)	88 (73%)	120 (100%)

Fuente: Resultados de Laboratorio.

En nuestro estudio se encontró un 13% (15/120) de positividad solamente para NS1, un 19% (23/120) para IgM, y un 8% (9/120) de positividad por ambas pruebas, para un porcentaje total del 20% de NS1-positivo y un 27% en IgM de dengue-positivo. Con una positividad global de 39% (47/120) dengue-positivo respectivamente. La cantidad de casos negativos fue del 61% (73/120) de dichos casos estudiados (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Este estudio parte de la premisa que la combinación de la determinación de antígenos NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue incrementa la tasa de diagnóstico de la enfermedad del dengue. Los resultados encontrados demuestran que efectivamente la combinación de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue incrementan sustancialmente el número de casos confirmados como dengue-positivo en pacientes hospitalizados, es decir, mediante la determinación de IgM solamente se hubiese confirmado 27% de los casos, pero al sumar el análisis de NS1 incrementó hasta 39%. Durante el estudio se documentó la circulación de tres de los cuatro serotipos (Den-1, Den-2, y Den-3), de este virus, donde la mayoría correspondían al serotipo 3, donde las infecciones secundarias resultan ser muy comunes. Se recolectó únicamente una muestra por paciente, lo considerable hubiese sido tomar muestras pareadas, la primera en fase aguda y la segunda en fase convaleciente, esto permitiría hacer los análisis de IgG anti-dengue e investigar seroconversión, pues algunos estudios sugieren que la sensibilidad de la prueba de NS1 es serotipo dependiente y menos efectiva en infecciones secundarias. Este estudio pone de manifiesto que la detección de antígeno NS1 en combinación con anticuerpos IgM aumenta la sensibilidad de diagnóstico de dengue en fase aguda y se extiende la ventana de detección mejorando la utilidad clínica de las pruebas rápidas inmuno-cromatográficas para dengue coincidiendo con un estudio realizado por Scott R, et.al., en el 2011.¹⁶

Un estudio realizado por Tricou, et.al., en el 2011, encontró que la detección de NS1 y anticuerpos IgM tienen ventanas complementarias de detección observándose una mejora gradual de la sensibilidad a partir del 2do día de infección mediante la detección del antígeno NS1 combinado con anticuerpos IgM.³⁰

El diagnóstico precoz del dengue es importante ya que permitiría un mejor manejo clínico del paciente. González A, et.al., estudiaron una cohorte de 328 pacientes hospitalizados por dengue en los años 2006 y 2007 en Bucaramanga, Colombia, observando que la edad fue el factor más determinante de la gravedad, los niños ≤ 5 años presentaban los síntomas típicos del

dengue con menos frecuencia, pero con mayor severidad. En dicho estudio la combinación de síntomas y hallazgos de laboratorio en el día del ingreso permitió predecir la aparición de complicaciones como: ascitis, derrame pleural y sangre, y un mayor riesgo de desarrollar insuficiencia respiratoria.³⁶

En este estudio el 98% de los 120 pacientes hospitalizados presentaron las manifestaciones típicas de la fiebre por dengue (Tabla.2). Un diagnóstico rápido y la clasificación de la infección por el VD son importantes para el manejo clínico oportuno y control epidemiológico de la enfermedad, donde las infecciones secundarias son de esperar debido a la co-circulación de los diferentes serotipos a su vez se debe considerar que la sintomatología en curso puede obedecer a otras patologías con presentación clínica muy similar a la del dengue; es posible desarrollar un cuadro de FHD en pacientes con una infección primaria y en estos casos tampoco se debe descartar una co-infección.³³

La detección de NS1 en fase aguda se ha propuesto para el diagnóstico temprano de la enfermedad por dengue.³⁵ Si bien es cierto la fase crítica de los pacientes, es en los primeros días de evolución de la enfermedad, por lo que el abordaje clínico en esta fase no se beneficia con la determinación de anticuerpos IgM anti-dengue, que generalmente alcanzan niveles detectables después del quinto día de evolución de la enfermedad.⁴⁰

La mayor frecuencia de positividad de NS1 se encontró en los niños ≤ 5 años y se observó una disminución con el incremento de la edad, en dicho grupo etáreo, también se encontró mayor frecuencia de IgM-positivos pero a medida que aumentaba la edad no se observó ninguna tendencia (Fig. 2). La explicación de hallazgo puede deberse a ciertas condiciones ya que la prueba NS1 es una herramienta específica para el diagnóstico del dengue agudo, aunque la sensibilidad del método por si solo (65%), se ve influenciada por el nivel de viremia y la respuesta inmune humoral,³⁰ la cinética de la desaparición de NS1 en las muestras con infecciones primarias, el rápido aumento de una respuesta de anticuerpos IgG en las muestras de ensayo y la presencia de una infección secundaria los niveles de NS1 pueden ser rápidamente enmascarados por anticuerpos circulantes o borrados de la circulación.¹⁶ Se debe tener presente que los cuatro serotipos del VD son antigénicamente distintos, y pueden

provocar una reactividad cruzada no deseada y en co-circulación de otros miembros de la familia Flaviviridae permitiendo la formación de complejos auto-inmunes debido a que los flavivirus comparten epítomos comunes de grupo, en particular en la proteína estructural E de envoltura.¹⁶

Al incrementar la edad aumenta el número de exposiciones al VD la detección de antígeno en la fase aguda de infecciones secundarias puede verse comprometida por la pre-existentes de IgG formando inmunocomplejos que se dirigen a la NS1. Se ha demostrado en otros estudios que altas concentraciones de este antígeno puede ser detectado en pacientes con infecciones primarias y secundarias hasta 9 días después de la aparición de la enfermedad donde NS1 es sintetizada por todos los flavivirus y secretada por las células infectadas. La presencia de NS1 secretada (NS1s) en el torrente sanguíneo estimula una respuesta humoral fuerte, y se encontró que NS1 puede ser detectable hasta 14 días después de la aparición de la enfermedad donde las personas hubiesen estado expuestas a varios flavivirus a medida que viajan a regiones afectadas por dengue,³⁰ lo que se traduce al fortalecimiento de la capacidad inmunológica para responder a la infección, estas exposiciones pueden generar anticuerpos anti-NS1 que van a responder ante la presencia de antígenos circulantes en sangre, pudiendo presentar una prueba NS1-negativa. En contraste los anticuerpos IgM anti-dengue no muestran tendencias porque estos son detectables cada vez que el individuo se infecta.³⁹

En este estudio la detección de NS1 fue relativamente alta durante los 3 primeros días de enfermedad, además, se observó que a medida que incrementa la frecuencia de IgM, disminuye la frecuencia de NS1(Fig.1), encontrándose resultados similares en un estudio realizado en el 2010 por Wang S, et al.⁵ Estas observaciones son interesantes porque aparentemente a medida que incrementa la respuesta inmunológica disminuye la circulación de NS1 en sangre, es decir, se produce una presión sobre la replicación viral. No obstante, encontramos 3 casos NS1-positivos en el día 6to, el cual es considerado con mayores títulos de IgM y 2 NS1-positivos uno en el día 7mo y otro en el 10mo, probablemente algunos factores genéticos del huésped han permitido que el virus siga replicándose en presencia de anticuerpos IgM. Otros investigadores han encontrado resultados similares.²³ La cantidad de NS1s en el

suero de individuos infectados con el VD ha demostrado que se correlaciona directamente con la viremia y la patogénesis de la enfermedad.²⁴

La IgM es detectable inicialmente en sueros de fase aguda entre el día 3 y 7 después de la aparición de la fiebre en los pacientes, encontrándose relativamente alta frecuencia en aquellos que presentaron 6 días de infección. La detección de IgM es muy importante en el diagnóstico de dengue ya que estos se mantienen elevados hasta finales de la 2da semana (de 13 a 15 días) y descienden hacia los 28 días, su presencia es indicio de infección primaria causada por cualquiera de los cuatro serotipos del VD.³⁷

En las infecciones secundarias los niveles de anticuerpos IgM pueden aparecer en bajas concentraciones y en infección primaria una respuesta de anticuerpos IgM, aparece en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que la toma de muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del quinto día del establecimiento de la enfermedad, estos anticuerpos aparecen levemente antes de los anticuerpos IgG, al 5to día están presentes en el 80% de los pacientes, entre el 6to y 10mo día en el 93% y entre el 10mo y 20mo día en 99%, algunos pacientes pueden presentar al segundo o al cuarto día y otros tardan al menos 7 u 8 días. La IgM deja de detectarse a los 60 días, sin embargo persisten hasta los 90 días.³⁸ En nuestro no se evaluó el tipo de infección que presentaban los pacientes ya sea primaria o secundaria, por lo que se sugiere realizar otras investigaciones que complementen la detección de NS1 con la determinación de anticuerpos IgM/IgG como herramienta importante en el incremento de la identificación de casos que sería potencialmente útil para el diagnóstico de la enfermedad del dengue y un mejor manejo clínico de los pacientes infectados por el VD.

CONCLUSIONES

1. Se encontró asociación de riesgo (OR= 4.6) en el grupo de edad (0-5 años) en presencia de NS1-positivo, IgM-positivo, o ambos marcadores, con un porcentaje de (50%).
2. Se observó diferencias estadísticamente significativas (OR= 3.8, p= 0.003) entre dengue-positivos y el género femenino.
3. El 98% de los pacientes estudiados presentaron las manifestaciones típicas de la fiebre por dengue.
4. La frecuencia de positividad en NS1 e IgM en los pacientes investigados en este estudio fue de 20% y 27% respectivamente, y el 8% fueron positivos a ambas pruebas.
5. El 39% de casos investigados en este estudio fue designado como dengue-positivo en base a los resultados obtenidos por la prueba inmunocromatográfica NS1 y ELISA IgM de Captura.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la toma de muestras pareadas para investigar si en infecciones secundarias la prueba NS1 tiene el mismo alcance que en este estudio.
2. Investigar si la sensibilidad de la prueba NS1 con la determinación del serotipo, es serotipo dependiente.
3. Investigar si la combinación de detección de los métodos NS1, IgM/IgG y PCR ayudaría al incremento de la confirmación en la detección de casos de dengue.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS/OPS. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Organización Panamericana de Salud. Publicación Científica No. 548. Washington DC; 1995. 109
2. Nogueira R, Schatzmayr H, et, al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnostics of dengue in Brazil. Lima, dos Santos FB. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4: e738.
3. Carvajal P, Márquez J. Frecuencia de anticuerpos anti-dengue IgM/IgG en pacientes febriles que asistieron al Centro de Salud Clínico Trinidad G. N. Matagalpa, 2007, Tesis.
4. Xu H, Di B, et. al. "Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating non structural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections", JC Microbiology. 2006; 44: 2872-8.
5. Wang SM, Sekaran SD, Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection, Malaysia, J. Clinic Microbiology. 2010; 48:2793-7.
6. Bessoff K, Phoutrides E, et, al. Utility of a commercial non structural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool, Clinic Vaccin Immunol. 2010; 17:949-53.
7. Hu D, Di B, et, al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection, J. Clinic Virology, PLoS Negl Trop Dis 2011; 8:47.
8. Dussart P, Petit L, et, al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum, PLoS Negl Trop Dis, 2008; 2:e280.
9. Hang VT, Nguyet N, et, al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viremia and antibody responses. PLoS Negl Trop Dis, 2009; 3:e360.
10. Lima Mda R, Nogueira R, et, al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil dos Santos FB, PLoS Negl Trop Dis, 2010; 4:e738.

11. Senaka Rajapakse Dengue shock Journal of Emergencies, Trauma, and Shock. 2011, 4:120–127.
12. Atías A. Neghme A. Parasitología Clínica, 2da edición, Mediterráneo, Santiago Chile, 399-404, 1988.
13. Ministerio de Salud de Nicaragua, Acevedo Fco, Técnicas de control y vigilancia del *Aedes aegypti* y el *A. albopictus*, Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial, MINSANIC. Managua, 1989.
14. Jenny G, Low H, et, al. The Early Clinical Features of Dengue in Adults: Challenges for Early Clinical Diagnosis PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5: e1191.
15. Matarama M, Navarro R, et, al. Medicina Interna Diagnóstico y Tratamiento, editorial Ciencias Médicas Ecimed, La Habana, Cuba, 572-577, 2005.
16. Scott R Fry, Meyer M, et, al. The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5:e1199.
17. Guzmán M. Revista Cubana de Medicina Tropical *Dengue* y fiebre hemorrágica,2008. <http://www.minsa.com.habana,cuba.edu.uy/espanol/revisiontemas/tema10/den6290.htm>
18. Mims C, Playfair J, et, al. Microbiología Médica, 2da ed, Madrid-España Harcourt, 1998.
19. Ministerio de Salud, Dirección General de Servicios de Salud, Normativa para el Manejo Hospitalario de Dengue en niños y adolescentes, Managua, 2008.
20. Murray P, Rosenthal K, et, al. Médica Microbiology, Madrid-España, 5th,ed, Elsevier, S.A, 637-645, 2006.
21. Costa A, Santos J, et, al. Dengue: epidemiological aspects and the first outbreak in the Middle Solimões Region of Coari in the State of Amazonas from 2008 to 2009, Rev S. Brazil Med Trop. 2011; 44:471-4.
22. Cheong-Huat T, Pei-Sze J, et, al. Evaluation of the Dengue NS1 Ag Strip_ for Detection of Dengue Virus Antigen in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Vector-borne and Zoonotic Diseases. 11, 6, 2011

23. Duong V, Ly S, et, al. Factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity, Institute Pasteur in Cambodia, *J. Clinical and virological PLoS Negl Trop Dis*, 2011;5, e1244.
24. Jie Li, Dongmei Hu, et, al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Format Tissue Culture Infectious Dose-50 Test for Titrating Dengue Virus, *PLoS One*. 2011; 6: e22553
25. Falconar AK, Martinez F.et, al. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. *PLoS One*. 2011; 6:e21024.
26. Lai CY, Tsai WY, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *Virology, PLoS Negl Trop Dis*, 2008; 13: 6631-43.
27. Ludert J, Mosso C, et, al. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells, *J.V.PLoS Negl Trop Dis*, 2008; 5:51.
28. Pan American Health Organization (PAHO), *Dengue and dengue hemorrhagic fever in the America: Guidelines for prevention and control*. Washington. (Scientific publication N° 548) 1994.
29. Youn S, Cho H, et al. A short N-terminal peptide motif on flavivirus no structural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition, *J Virology PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 84: 9516-32.
30. Tricou V, Vu HT, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and anti-body responses, *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 142.
31. Osorio L, Ramírez M, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 7: 361.
32. Datta S, Wattal C, *Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection*, Department of Clinical Microbiology, Sir Ganga Ram Hospital, Rajinder Nagar, New Delhi, India; 28, 2th ed., 2010:107-110.

33. Méndez Á, González G. Manifestaciones Clínica inusuales del dengue hemorrágico en niños. Departamento de Pediatría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. *Biomédica* 2006; 26: 61-70
34. OPS/OMS.-Dengue-Guidelines-for-Diagnosis,-Treatment, Prevention,-control-Boliv.-2009 http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf.
35. Veasna D, Sowath L, et al. Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen-Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity Clinical and Virological *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5: e1244
36. González A, Martínez R, et, al. La evolución clínica de dengue en pacientes hospitalizados, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander. *Biomédica*, 2008; 28:531-43
37. Rosanna W. Peeling, Harvey A, et, al. Evaluation of diagnostic tests: dengue WHO, on behalf of TDR (WHO/TDR) 2010. doi:10.1038/nrmicro2459
38. Instituto Pedro Kouri (IPK). 1990. Manual de Laboratorio para el Diagnóstico de Dengue. INCAP Y OPS. 81pp.
39. Dongmei Hu, Biao Di, et, al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary Infection. *J. Virol*, 2011; 8: 47
40. Sáenz-Bolaños, et al Evaluación de una prueba rápida para diagnóstico de dengue en el nivel local Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, INCIENSA AMC, vol 50 (4), octubre-diciembre 2008

ANEXOS

ANEXO. 1. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS. UNAN – LEÓN
FICHA EPIDEMIOLOGICA

Estudio: Efecto de la determinación del antígeno viral NS1 y anticuerpos IgM anti-dengue sobre el diagnóstico integral del dengue en pacientes hospitalizados en el HEODRA durante el período de Noviembre 2009 a Octubre 2010.

1. DATOS GENERALES

1.1 SILAIS: _____ 1.2. Municipio: _____ 1.3. Unidad de Salud: _____
1.4. Número de expediente: _____ 1.5. Cod. Vivienda: _____ 1.6. Fecha ____/____/____

2. DATOS PERSONALES

2.1. Nombres y Apellidos: _____
2.2. Edad ____/____ 2.3. Fecha de Nacimiento: ____/____/____ 2.4 Sexo: F () M () 2.5. Ocupación: _____
2.6. Nombre del padre y/o madre: _____
2.7. Dirección: _____
2.8. Procedencia: Urbano _____ Rural _____ 2.9. Embarazada: _____ Tiempo de embarazo: _____ meses _____
2.10. Enfermedades crónicas: _____ a. Asma _____ b. Alergia Respiratoria _____ c. Alergia dermatológica _____
d. Diabetes _____ e. Otros _____
2.12. Enfermedad aguda adicional: a. Malaria _____ b. Neumonía _____ c. Infec. De vías urinarias _____ d. Otra _____

3. DATOS CLINICOS

4.1. Fecha de inicio de los síntomas: ____ / ____ / ____ 4.2. Fecha de toma de la muestra: ____ / ____ / ____
4.3. Hora de toma de la muestra: ____ a.m. / p.m. 4.4. Hora de refrigeración de la muestra: ____ a.m. / p.m.

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

4.5. Síntomas:

a. Fiebre _____
b. cefalea _____
c. mialgia _____
d. artralgia _____
e. dolor retroorbital _____
f. dolor abdominal _____
g. diarrea _____
h. escalofríos _____
i. anorexia _____

4.6. Signos:

a. rash _____
b. epistaxis _____
c. petequias _____
d. melenas _____
e. hematemesis _____
f. gingivorragia _____
g. hematuria _____
h. hemorragia vaginal _____
i. derrame pleural _____
j. tos _____
k. piel fría _____
l. ascitis _____

m. prueba del torniquete positivo _____
n. P/ A (sistólica / diastólica) ____ mmHg
ñ. Frec. Cardíaca o pulso ____ / min.
o. llenado capilar ____ / seg.
p. temperatura ____ °C.
q. Frec. Respiratoria ____ / min.
r. vómito _____
s. hepatomegalia _____
t. disnea _____
u. ictericia _____
v. radiografía _____
w. ultrasonido _____

4.7. AL INGRESO HOSPITALARIO: MARCAR: SI (S) NO (N) DESCONOCIDO (D)

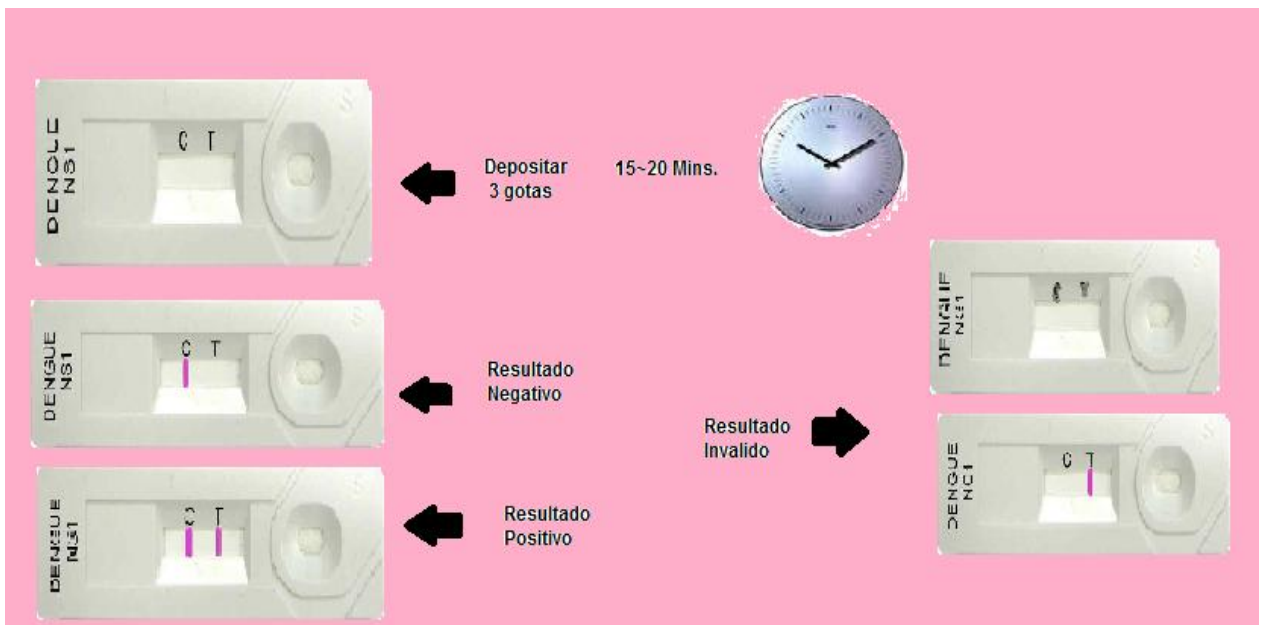
PRESENCIA DE SIGNOS DE DESHIDRATACION: a. llanto sin lágrimas _____ b. mucosas secas _____ c. globo ocular hendido _____

4. LABORATORIO CLINICO

5.1. HEMÁTICA: hematocrito ____ Hemoglob. ____ Plaquetas ____ G/Blancos ____ LINF ____ SEG ____ MON ____
5.2. Resultados serológicos y Viroológicos de Dengue: **Inmunocromatografía:**
ELISA IgM ____ IH ____ ELISA Inhb. ____ RT – PCR ____ SD Dengue NS1 Ag: _____
Resultado Final _____ Gota Gruesa _____

DETERMINACION DEL ANTIGENO VIRAL NS1

(Inmunocromatografía “SD dengue NS1 Ag”)



DENGUE IgM CAPTURE ELISA E-DEN01M/E-DEN01M05

ANTIGEN-VIAL
Stabilised dengue-antigens



ASSAY PLATE
 α -human IgM



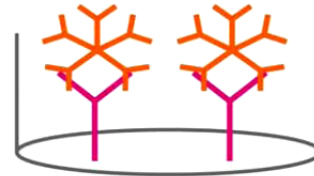
1. Add 10 μ L of Antigen in 2.5 mL of Antigen Diluent and mix. Unused concentrated antigen should be stored at 2-8°C.
2. Remove required volume of diluted antigen and mix with an equal volume of MAb Tracer in a separate glass vial or test tube. DISCARD UNUSED DILUTED ANTIGEN.

3. Add 100 μ L of diluted samples and Controls to assay plate.

- 4a. Incubate 1 hour at 20-25°C.

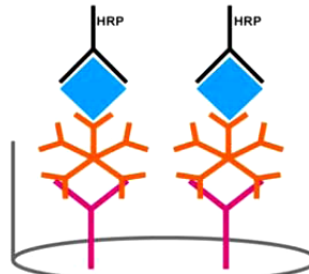


- 4b. Cover plate and incubate 1 hour at 37°C \pm 1°C



5. Wash the assay plate x 6. After gentle rotation to mix the antigen-MAb solution, transfer 100 μ L per well to the assay plate

6. Cover plate and incubate 1 hour at 37°C \pm 1°C



7. Wash the assay plate x 6. After the final wash, add 100 μ L TMB per well and incubate at 20-25°C for 10 minutes. Stop the reaction with 100 μ L Stop Solution and read at 450 nm (Reference 600 - 650 nm).

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Concepto	Indicador	Escala o Categoría
Edad	Años transcurridos a partir de la fecha de nacimiento	Ficha de recolección de datos	0-5 años 6-15 años 16-30 años 31 a más
Sexo	Condición de género determinada por características físicas y genéticas.	Ficha de recolección de datos	Femenino Masculino
Procedencia	Lugar de origen del paciente.	Ficha de recolección de datos	Urbana Rural
Ocupación	Actividad a la que una persona se dedica en un determinado tiempo.	Ficha de recolección de datos	Obrero Ama de casa Estudiante Profesional
Características clínicas	Signos y síntomas que presentan los pacientes durante su hospitalización hasta en día de la toma de muestra para el análisis de laboratorio.	Ficha de recolección de datos	Fiebre Cefalea Mialgias Artralgias Dolor-retroocular Anorexia Vomitos Rash Dolor abdominal Hemorragias Otros
SD Dengue NS1 Ag	Método inmunocromatográfica que permite identificar la presencia de antígenos NS1.	Presencia o ausencia de la proteína no estructural NS1.	Positivo Negativo
ELISA de Captura IgM Dengue (Panbio)	Método Inmunoensayo enzimático, cualitativo para la detección de anticuerpos IgM anti-dengue en los pacientes con clínica y síntomas compatibles con la fiebre del dengue.	Lecturas de Absorbancia mayor al CUTT OFF	Positivo Negativo