

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Facultad de Ciencias Médicas**

**Centro de Investigación en Demografía y Salud
CIDS/UNAN-León**



Tesis

***Para optar al título de Máster en Ciencias
con mención en Epidemiología.***

**Aparición temprana de trastornos circulatorios del dengue en pediatría
durante la epidemia del 2009. Un estudio prospectivo hospitalario en
Nicaragua.**

Autor: Dr. Gamaliel Gutiérrez Castillo.

**Tutores: Filemón Bucardo, PhD.
Departamento de Microbiología UNAN-León**

**Lic. Wilton Pérez, MSc
CIDS/UNAN-León.**

León, Febrero, 2012.

“Una sola muerte de un niño por dengue es suficiente para destruir por completo a una familia”

Dr. José Luis San Martín, 2011.
Asesor Regional de Dengue – OPS/OMS.

“Este trabajo está dedicado a Dios fuente de vida y bendiciones. A mí familia por su apoyo incondicional durante todo este tiempo”

AGRADECIMIENTOS

No existen palabras suficientes para agradecer;

Mi tutor Dr. Filemón Bucardo por su tiempo y conocimiento para la elaboración de este trabajo.

A mi amigo y compañero MSc. Wilton Pérez, por enseñarme tanto durante mi formación y en este trabajo investigativo.

A Dra. Eva Harris por darme la oportunidad de trabajar a su lado y ser partícipe de estudios de investigación de dengue.

Al Dr. Ángel Balmaseda quien me ha guiado durante mi profesión y de quien he aprendido mucho.

Mi gran amigo y colega Ing. Douglas Elizondo, sin él el análisis de datos no habría sido posible. Muchas gracias por tu tiempo y conocimiento sobre manejo de datos.

A mis colegas Dra. María Ángeles Pérez y Dr. Federico Narváez con quienes he compartido mucho tiempo de trabajo.

A mi colega Ing. Andrea Núñez por todo su apoyo durante mi trabajo.

A Dra. Aubree Gordon, por sus consejos y valiosos aportes de conocimientos.

A mis maestros de la maestría por darme la oportunidad de una educación y formación de calidad.



UNIVERSIDA NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA.
(UNAN-León)
Facultad de Ciencias Médicas.

“Hacia el Bicentenario de la UNAN-León: 1812 – 2012”

Martes, Julio 12, 2011

Opinión de Tutor

Como profesor de la UNAN-León, interesado en el estudio de los virus endémicos en Nicaragua, considero que las presentaciones atípicas de las infecciones virales pueden explicarse tomando en consideración el agente causal (cepas o variantes genéticas), factores del huésped y el medio ambiente.

Hace aproximadamente un año el Dr. Gamaliel Gutiérrez, me comentó sobre una de estas presentaciones atípicas del dengue y de su interés de investigar factores de riesgo asociados con trastornos circulatorios tempranos durante el curso de la enfermedad del dengue en un brote epidémico ocurrido en el 2009.

Después aplicar un diseño metodológico apropiado y analizar detalladamente el comportamiento clínico y los factores epidemiológicos de pacientes hospitalizados con dengue durante dicho brote, y contrastar estos datos con estudios previos el Dr. Gutiérrez, encontró que efectivamente el brote de dengue del 2009 fue uno de los más severos de los últimos 10 años. Además, reveló que los trastornos circulatorios (mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado), ocurrieron con más frecuencia y más temprano que lo esperado. Dichos hallazgos se asociaron con la infección secundaria y el serotipo circulante (DenV-1), pero el mayor riesgo fue haberse infectado con dengue posteriormente al brote de influenza A H1N1. El estudio del Dr. Gutiérrez sugiere que las infecciones concomitantes dengue-influenza (AH1N1) podría explicar las observaciones atípicas aquí descritas.

Es importante mencionar que el apoyo de reconocidos investigadores como Dra. Eva Harris y Dr. Ángel Balmaseda, y el excelente trabajo científico desarrollado el Dr. Gutiérrez ha permitido que parte de los resultados presentados en esta tesis se hallan publicado en la revista científica PLOS (Gutiérrez G et. al 2011).

Finalmente deseo felicitar al Dr. Gutiérrez por su contribución científica al conocimiento de esta compleja e importante enfermedad.

Dr. Filemón Bucardo.
Profesor Titular UNAN-León.
PhD Virología Molecular.

RESUMEN.

Se realizó un estudio de cohorte con el objetivo de determinar la sobrevida de los trastornos circulatorios en los pacientes con dengue e identificar los factores de riesgos asociados a la aparición temprana y frecuente de estos trastornos. El estudio fue llevado a cabo en el hospital infantil Manuel de Jesús Rivera en Managua, Nicaragua, entre los años 2005 y 2009.

Se estudiaron un total de 544 pacientes positivos para dengue confirmados por laboratorio a través de PCR-RT, aislamiento viral y/o serología de sueros pareados. La fuente de información fue secundaria, obtenida de una base de datos del *Estudio Hospitalario prospectivo de clasificación, manejo y diagnóstico de casos de dengue en Nicaragua*. Se comparó el periodo 2009 (con 212 pacientes) vs. el período 2005-2008 (con 332 pacientes).

El sexo, la edad y el tipo manejo de pacientes (hospitalizados/ambulatorios) no tuvo diferencia entre el período 2009 vs 2005-2008 ($p > 0.05$). El serotipo Denv-3 y la respuesta inmune secundaria fue significativamente mayor ($p = 0.000$) en el período 2009. Se observó que, según la nueva clasificación, el 2009 tuvo mayor proporción de casos severos ($p = 0.025$) que el período 2005-2008. Se determinó que durante el 2009 los trastornos circulatorios (frialdad distal, mal llenado capilar y choque compensado) tuvieron una mediana de aparición al 3er día (RI 2-4) de la enfermedad y en el período 2005-2008 la mediana de aparición fue al 5to día (RI 4-6) de la enfermedad. Se encontró que la proporción de casos con trastornos circulatorios fue mayor en el periodo 2009 ($p = 0.000$) que el periodo previo. El análisis de sobrevida de Kaplan-Meier estimó que la probabilidad de aparición de estos trastornos fue mayor durante el 2009 que en el período previo (log Rank test = 0.000). Los factores de riesgos asociados a los trastornos circulatorios fueron; período 2009, la respuesta inmune secundaria y la infección por serotipo denv1 ($p < 0.05$). La edad y el sexo no mostraron asociación con los trastornos circulatorios.

La exposición al dengue del período 2009 fue el principal factor de riesgo asociado a los trastornos circulatorios y es posible que la coinfección con el virus de la influenza A H1N1 pandémica explique el comportamiento inusual de los casos de dengue en esa temporada. Es necesario la realización de investigaciones futuras que establezcan si las coinfecciones de esta naturaleza pueden desencadenar manifestaciones severas de la enfermedad.

INDICE

Contenido	Pag.
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Opinión del tutor	III
Resumen	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	3
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	5
MARCO TEORICO.....	6
Definición y epidemiología del dengue	6
Estructura del virus del dengue	7
Inmunoquímica de los flavivirus	8
Inmunopatogénesis del virus del dengue	10
Clasificación de severidad del dengue (Clasificación tradicional)	12
Nueva propuesta de clasificación de severidad del dengue	14
Fases del dengue	16
Confirmación por laboratorio de las infecciones por dengue	21
METODOLOGÍA.....	23
Tipo de estudio, población, lugar y período de estudio	23
Criterios de inclusión/exclusión, factor de exposición, eventos y tiempo de seguimiento de estudio	23
Fuente de información	24
Plan de análisis	25
Operacionalización de variables	27
Consideraciones éticas	28
RESULTADOS.....	30
Generalidades	30
Clasificación de severidad	31
Trastornos circulatorios: análisis descriptivo	32
Trastornos circulatorios: análisis de sobrevida	36
Trastornos circulatorios: análisis de riesgo – modelo de regresión de Cox	38
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48
ANEXOS.....	52

INTRODUCCIÓN.

El dengue es una infección viral causada por cuatro diferentes serotipos (Denv-1, Denv-2, Denv-3 y Denv-4) y transmitida por un mosquito. Debido a que es una enfermedad sistémica y dinámica, puede ir desde lo asintomático hasta manifestaciones clínicas severas ¹⁻². Se han reconocido tres fases en la evolución natural de la enfermedad; una febril, una crítica y la de recuperación. La fase febril puede durar entre 2 y 7 días ³ y usualmente está marcada por la aparición brusca de fiebre alta regularmente acompañada de rubor facial, eritema, mialgias, artralgias y cefalea. Una vez que la temperatura cae a los 37.5-38°C o menos y permanece por debajo de este valor, puede ocurrir un incremento de la permeabilidad capilar junto con un aumento en el valor de hematocrito (hemoconcentración), marcando el inicio de la fase crítica. Esta fase generalmente ocurre entre el 3er a 7mo día de la enfermedad ^{1, 4-5}.

El aumento progresivo de la permeabilidad capilar puede conllevar a un choque, el cual ocurre normalmente durante la defervescencia, entre el 4to y 5to día de la enfermedad ⁵⁻⁶. Durante la fase inicial del choque actúan mecanismos compensatorios del cuerpo que mantienen la presión arterial en valores normales, pero que también producen taquicardia y vasoconstricción periférica, produciendo frialdad distal y mal llenado capilar ⁵⁻⁶.

En Nicaragua el dengue es endémico. La epidemia de dengue del año 2009 ha sido una de las más grandes ocurridas en Nicaragua y se caracterizó, no sólo por la gran afluencia de pacientes a las unidades hospitalarias, sino también por la gran cantidad de casos con de trastornos circulatorios, inusualmente tempranos (primeros 3 días de la enfermedad), tales como; mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado. En el año 2009 la epidemia de dengue coincidió con la epidemia de la Influenza A H1N1, reportándose la presencia de co-infecciones dengue-influenza ⁷.

A través de un análisis de supervivencia, este estudio brinda una descripción detallada de la aparición temprana de los trastornos circulatorios en pacientes pediátricos con dengue durante la epidemia del año 2009, aportando de esta manera más datos sobre la caracterización clínica de esta patología. Además con este estudio se identifican los probables factores que contribuyeron en estas inusuales manifestaciones clínicas.

ANTECEDENTES.

Un estudio publicado por *Balmaseda et al* en el 2006 en dos hospitales de Nicaragua, sobre las diferencias de manifestaciones clínicas según serotipo del virus del dengue, encontraron que los niños en edades de 10 a 14 años presentaron más riesgo de presentar manifestaciones severas (fuga plasmática, choque, trombocitopenia marcada o hemorragia interna) durante la circulación del Denv-1 (OR 5.51, IC95% 2.67-11.61) e igualmente encontró que el Denv-1 era el serotipo más asociado a fuga capilar (OR 2.36, IC95% 1.80-3.09). En este estudio también se encontró que la respuesta inmune secundaria fue un factor de riesgo para la presencia de manifestaciones severas en el período de 1999-2001 (OR 1.70, IC95% 1.09-2.75, p 0.01) ².

La respuesta inmune secundaria en los pacientes con dengue se ha descrito como uno de los factores que se asocian a las manifestaciones de severidad en los pacientes con dengue. *Vaughn et al* en el año 2000 publicaron un estudio donde se plantea que la respuesta inmune secundaria en los pacientes con dengue está correlacionado con la severidad. En su estudio el 81% de los pacientes con una respuesta inmune secundaria presentaron más casos de severidad en comparación con los pacientes que tenían respuesta inmune primaria⁸. En un estudio realizado en Nicaragua por *Hammond et al*, se encontró que la respuesta inmune secundaria en los pacientes con dengue fue un factor de riesgo para presentar formas graves del dengue (OR 1.59, IC95% 1.1 – 2.4), incluyendo la fuga capilar (OR 1.33, IC95% 0.8 - 2.2), aunque esta última de manera no significativa ⁹.

Un reporte de caso en Puerto Rico realizado por *Rodríguez et al* sobre la confección de Influenza A H1N1 y el virus del dengue describe la dificultad de diferenciar el cuadro clínico del dengue y el de influenza y la importancia de sospechar la co-infección de estos dos virus principalmente en la presencia de manifestaciones severas ¹⁰. Igualmente en un estudio de serie de casos realizado por *Pérez et al*, demostró la presencia de co-infección de pacientes con dengue y el virus pandémico de la influenza A H1N1 en donde las manifestaciones fueron severas e incluso un fatal ⁷.

Ninguno de los estudios publicados ha descrito a la aparición de los trastornos hemodinámicos del dengue en función de tiempo a través de un análisis de sobrevivencia.

JUSTIFICACIÓN

La epidemia de dengue del año 2009 ha sido una de las más grandes ocurridas en Nicaragua desde el año 1998. Esta epidemia se caracterizó porque la mayoría de los casos con trastornos circulatorios (frialdad distal, mal llenado capilar, choque compensado) se presentaron en los primeros 3 días de la enfermedad, cuando dichos trastornos normalmente ocurren entre el 4to y 5to día de la enfermedad en los casos de dengue.

Actualmente se conocen diversos factores de riesgo que se asocian con la severidad del dengue, pero ninguno de ellos se asocia con la aparición temprana de trastornos circulatorios como se observó en esta epidemia.

Los hallazgos de este estudio contribuyen al conocimiento del comportamiento clínico de esta enfermedad. A través de este estudio se describe en detalle el comportamiento inusual de la epidemia del dengue en el año 2009, y se explican los factores que influyeron en la aparición temprana de estos trastornos circulatorios.

HIPOTESIS

Los trastornos circulatorios se presentaron de manera más temprana en los pacientes expuestos al dengue durante la temporada 2009 en comparación con la temporada 2005-2008, probablemente por la co-infección con influenza pandémica A H1N1.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Describir el comportamiento de los trastornos circulatorios en los pacientes con dengue e investigar los factores de riesgos asociados con la aparición temprana de dichos trastornos.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar a la población de estudio en términos de edad, sexo, respuesta inmune, serotipo, manejo y severidad.
2. Comparar la proporción de casos con trastornos circulatorios en pacientes con dengue en el período 2005-2008 y el período 2009, respectivamente
3. Determinar el tiempo de aparición (mediana) y la sobrevida de los trastornos circulatorios en pacientes con dengue en ambos períodos.
4. Identificar los factores de riesgos asociados al tiempo de aparición de los trastornos circulatorios.

MARCO TEORICO.

Definición.

La **Fiebre del Dengue (FD)** es un síndrome agudo febril benigno que se produce por varios virus transmitidos por artrópodos y caracterizado por fiebre bifásica, mialgias y/o artralgias, erupción cutánea, leucopenia y linfadenopatía ¹¹⁻¹². La **fiebre hemorrágica del Dengue (FHD)** es una enfermedad febril que se caracteriza por hemoconcentración, anomalías de la hemostasia, y en casos más graves, **por un síndrome de choque (SSD)** con pérdidas de proteínas ¹¹. Existen al menos cuatro tipos antigénicos distintos del virus del dengue, todos ellos miembros de la familia *Flaviviridae* ¹². Los serotipos conocidos son el 1, 2, 3 y 4. ¹³⁻¹⁴

Epidemiología.

El dengue en la enfermedad viral, transmitida por mosquito, más ampliamente distribuido en el mundo. En los últimos 50 años, la incidencia ha aumentado 30 veces incrementando su expansión geográfica a nuevo países y, en la década presente, ha migrado de zonas urbanas a zonas rurales. Un estimado de 50 millones de infecciones por dengue ocurren cada año y aproximadamente 2.5 billones de personas viven en países con zonas endémicas de dengue. ¹⁵

Dengue en las Américas. La interrupción en la transmisión del dengue en muchas de las regiones de la Organización Mundial de la Salud fue resultado de campañas de erradicación del *Aedes Aegypti*, principalmente durante los años de 1960 y a inicios de los 1970. Sin embargo, las medidas de control y vigilancia no fueron sostenidas y hubo reinfecciones subsecuentes del mosquito, seguida por epidemias en el Caribe, Centro y Sur América ¹⁵. Desde entonces la fiebre del dengue se ha expandido con epidemias cíclicas que ocurren cada 3 a 5 años. La mayor epidemia ocurrió en el año 2002 con más de 1 millón de casos reportados. ¹⁶

Desde el año 2001 al 2007, más de 30 países de América han notificados un total de 4,332,721 casos de dengue. El número de casos de dengue hemorrágica en el mismo período fue de 106,037. El total de muertes por dengue fue de 1,299, con una tasa de fatalidad del 1.2% ¹⁶

Dengue en Centroamérica y México. En el período del 2001 al 2007, un total de 545,049 casos de dengue fueron reportados, representando el 12.5% de casos en el continente americano. Se notificaron 35,746 casos de dengue hemorrágico y un total de 209 muertes durante el mismo período. Nicaragua tuvo 64 muertes (31%), seguido de Honduras con 52 (25%) y México con 29 (14%). Los serotipos DENV-1, -2 y -3 fueron los más frecuentes reportados.¹⁶

Dengue en Nicaragua año 2009. Hasta la semana epidemiológica (SE) 42 se registró un acumulado de 10.078 casos sospechosos de dengue, de los cuales 2.106 fueron confirmados por laboratorio; 57 casos de dengue hemorrágico y 8 defunciones por dengue. Los virus actualmente circulantes son el DEN-V 1, 2 y 3 con predominio del DEN-V 3. En la SE 42, cinco de los 17 departamentos se encuentran con tasas superior a la nacional (18.84 x 100.000 habitantes), siendo éstos; RAAS, Boaco, Chontales, Managua, Masaya, y Río San Juan¹⁷.

Dengue en Nicaragua año 2010. Hasta la SE 3, el Ministerio de Salud de Nicaragua informó la ocurrencia de 1.388 casos sospechosos de dengue, lo que representa un aumento de 370% con relación a igual periodo del 2009. Se notificaron 21 casos sospechosos de dengue hemorrágico y se han confirmado 2 muertes por dengue, ambas correspondientes al SILAIS León. La tasa de letalidad es de 9.5%. Lugares afectados: León, Managua y Carazo. Siendo el Departamento de León el lugar con mayor tasa de incidencia en el país (7,12 por 100.00 habitantes). Hasta la SE 3 se presentaba la siguiente situación: se han notificado 281 casos sospechosos, de los cuales 41 casos se han confirmado por laboratorio¹⁶.

Estructura del virus del dengue.

El virus del dengue es un virus ARN, monocatenario, esférico, perteneciente a la familia flaviviridae. Se conocen cuatro serotipos y cualquiera de ellos es capaz de producir la enfermedad. Estos cuatro serotipos son antigénicamente muy semejantes entre sí y la infección por un serotipo produce inmunidad de por vida para el mismo e inmunidad temporal para los otros serotipos¹⁸⁻²⁰.

El DENV consta de una simple cadena de ARN de sentido positivo, con un genoma de aproximadamente 11, 000 nucleótidos (nt) que se traduce como una sola poliproteína, que a

continuación es escindida en 3 proteínas estructurales: Capside (C), Membrana (M) y Envoltura (E) y 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B y NS5.

Las funciones de las proteínas no estructurales incluyen un ARN-dependiente de la ARN polimerasa (RdRp), metiltransferasa (NS5) y helicasa / proteasa (NS3). La región codificante está flanqueada por una 5'UTR (Región no traducida) de aproximadamente 98 nt y una 3'UTR de 388 – 462 nt ²¹.

El extremo 5' del ARN está cubierto por una caperuza, y el extremo 3' carece de cola de poli A. En ambos extremos del genoma están presentes secuencias no codificadoras necesarias para los procesos de replicación, transcripción y traducción y a las cuales se asocia la posible estructura secundaria del genoma. El codón de iniciación se corresponde con AUG, que da inicio a un marco de lectura abierto sin interrupción de aproximadamente 10.250 nucleótidos, donde están codificadas 10 proteínas virales. Las proteínas estructurales se localizan hacia la porción 5' Terminal y el segmento restante abarca las proteínas no estructurales ²¹.

Inmuno química de los Flavivirus.

Los anticuerpos neutralizantes del virus son aquellos que interaccionan con el virus y producen la inactivación del mismo, tal forma que el virus no es capaz de infectar o replicarse en cultivos celulares o animales. Los anticuerpos neutralizantes, son el tipo de anticuerpos de protección primaria elegidos para las vacunas de *Flavivirus*. La glicoproteína E de los *Flavivirus* es una proteína de fusión Clase II y es responsable del acoplamiento viral a los receptores celulares del huésped y es la mediadora de la fusión del virus a la membrana celular. Por lo tanto es la proteína viral más importante en lo que respecta a la infectividad vírica y es esencial obtener todos los anticuerpos virus neutralizantes específicos. Estos son todos los anticuerpos primarios anti – glicoproteína E, que son medidos con la Prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT). Otros anticuerpos específicos no anti – glicoproteína E por ejemplo, anticuerpos anti – NS1 han demostrado un efecto de protección al virus *in vivo* en pequeños modelos animales, sin embargo estos efectos no son medidos por medio de la interacción virión – anticuerpo ²².

La glicoproteína E, existe como 90 homodímeros de cabeza a cola en la superficie del virión. Un monómero de la glicoproteína E, puede ser dividido en tres dominios estructurales: DI, DII y DIII. El DII, conocido como dominio de dimerización, es una estructura larga que contiene

las secuencias hidrofóbicas de fusión de membrana. En el homodímero, la secuencia de fusión durante la replicación es protegida por una combinación de DIII, el monómero de glicosilación E y la proteína prM. Se ha demostrado que el DIII en DENV está involucrado en las funciones de acoplamiento a las células Vero de cultivos celulares. Este característico ligamento ha sido confirmado usando DIII expresado. El dominio DI contiene la molécula “bisagra” de la glicoproteína E. Como una proteína de fusión clase II, la glicoproteína E puede experimentar una canalización oligomérica ácida reorganizándose en un homodímero de fusión. Se cree que este evento ocurre en el endosoma, permitiéndole que la nucleocápside viral se escape hacia el citoplasma e inicie la síntesis de RNA y proteínas. Similarmente, se cree que la función de la proteína prM como una proteína de carabina para la glicoproteína E durante la maduración viral, es ayudar a mantener la estructura de la glicoproteína E hasta que la morfogénesis viral se complete y el virión salgan hacia las vesículas de acidificación exocíticas²²⁻²⁴.

Los dominios I, II y III son estructuras antigénicas. Los anticuerpos para ambos dominios DI y DII han demostrado neutralizar al virus. Los anticuerpos anti – DIII, tienden a ser anticuerpos poderosamente neutralizantes y son mas virus tipo – virus específicos. Los anticuerpos anti – DII son los anticuerpos de mayor reacción cruzada entre los virus y aunque ellos puedan neutralizar la infectividad del virus son usualmente menos potentes que los anticuerpos anti – DIII. Han sido identificados dos mecanismos de neutralización de los flavivirus: bloqueando la unión del virus a las células y bloqueando el proceso de fusión viral. Hasta hoy se desconoce cuántas moléculas de anticuerpos se necesitan para neutralizar la infectividad de un único virión²⁵.

Algunas evidencias sugieren que la proteína prM también puede inducir anticuerpos neutralizantes. La habilidad de los anticuerpos anti – prM de neutralizar los viriones está directamente relacionado con el proceso precursor de “prM a M”, el cual es mediado por células asociadas a viriones inmaduros y por enzimas por lo tanto son células tipo – específicas. Como se mencionó anteriormente, el propósito de la proteína prM parece ser de carabina de la glicoproteína E, durante la morfogénesis del virión y esta no es una función únicamente accesoria. Cabe mencionar que el DENV crece en células de cultivo de invertebrados y a menudo tiene una gran cantidad de proteína prM en el virión extracelular la cual puede reducir la infectividad viral y cambiar los epítopes de expresión. Aun no se ha determinado si este fenómeno ocurre en el mosquito vector²⁶.

6.8 Inmunopatogénesis del virus Dengue

La respuesta inmune de protección contra la infección del DENV es conducida por la presencia o ausencia de anticuerpos virus – neutralizantes y por la complicada respuesta de las células T con la ayuda de las síntesis de anticuerpos. En las infecciones por DENV se obtiene la respuesta de los anticuerpos IgM, IgG e IgA. La respuesta de IgM empieza temprano, frecuentemente antes de la aparición de los síntomas. Los anticuerpos IgM son usualmente detectables en ensayos serológicos entre 5 y 8 días después de iniciados los síntomas. Los anticuerpos IgA son detectables también y tienen una vida media similar a la IgM aunque con algunas variaciones en infecciones primarias y secundarias. Los anticuerpos IgG son detectables prontamente después de la infección y se mantienen durante años. La infección, con alguno de los serotipos de DENV produce inmunidad al serotipo en particular, sin embargo no es una protección a largo plazo contra la infección por alguno de los tres serotipos del virus Dengue ²⁷.

La reinfección con un serotipo distinto, por segunda o tercera vez puede producir “fiebre por dengue” (DF) o una infección más severa que resulta en “fiebre hemorrágica del dengue” (DHF) y/o “síndrome de choque por dengue” (DSS). Hay muchos mecanismos que tratan de explicar la severidad de las manifestaciones de la enfermedad en las infecciones secundarias por DENV, a pesar de todo la pre – existencia de anticuerpos reactivos a DENV, parece ser un factor que media la inducción de DHF/DSS. Probablemente los anticuerpos más implicados son aquellos de reacción cruzada entre serotipos, pero que no neutralizan múltiples serotipos del DENV. Los complejos DENV – anticuerpos no neutralizantes pueden hacer pasar al DENV, dentro de las células susceptibles a través de receptores FC expresados en la superficie celular, dando lugar al fenómeno conocido como “incremento de infección dependiente de anticuerpo (ADE) de la replicación viral ²⁸.

El concepto de ADE en las infecciones por DENV, ha sido estudiado por varios años, y sigue siendo importante objeto de estudio para quienes se interesan en el desarrollo de vacunas. Mientras la relevancia biológica in Vitro, del ADE permanece mal definida, nuestra comprensión sobre la especificidad de los anticuerpos que conduce a la protección o realce están mejorando. Se sabe que los anticuerpos obtenidos por DIII de la glicoproteína E, son neutralizantes y su alto potencial de neutralización se hace evidente en las infecciones de modelos animales, donde resultan ser protectores. Por otro lado, los anticuerpos obtenidos

para DI o DII poseen reacción cruzada entre los virus y han demostrado muy baja y en algunos casos ninguna capacidad de neutralizar al virus ²⁹.

Evidencia obtenida del virus West Nile (WNV), de humanos infectados por primera vez, cuyos linfocitos fueron usados para preparar anticuerpos monoclonales, indican que los anticuerpos de respuesta temprana fueron dirigidos a DII. Si la respuesta temprana de los anticuerpos a DENV es similar, entonces la respuesta humoral primaria probablemente consistiría en anticuerpos de reacción cruzada, y no en anticuerpos neutralizantes. Es también posible que en la infección secundaria con un serotipo diferente de DENV, haya una rápida respuesta de memoria que consista en anticuerpos anti – DENV de reacción cruzada, inducida por epítopes que comparten entre los serotipos de DENV y la abundancia de células B de memoria de reacción cruzada específicas para los epítopes de DI y DII ²².

La posibilidad teórica de ADE en infecciones por DENV, post vacunales que resulten en DHF/DSS obliga a pensar, que ninguna vacuna puede ser mejor que aquella que induzca anticuerpos neutralizantes al virus serotipo – específicos contra los cuatro serotipos, por tanto podría ser tetravalente e incluir virus de todos los cuatro serotipos del virus Dengue ²⁹.

Clasificación de severidad del dengue (Clasificación tradicional).

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) el dengue se puede clasificar en: fiebre del dengue (FD) y dengue hemorrágico (FHD) con sus cuatro grados de severidad, considerando los grados III y IV como síndrome de choque por dengue (SCD) ¹⁵.

Se habla de un probable **caso de dengue** ante la presencia de una enfermedad febril aguda (menor de 7 días de evolución) acompañada de 2 ó más de los siguientes síntomas o signos ¹⁵:

- Dolor de cabeza.
- Dolor retro orbital.
- Mialgia.
- Artralgia.
- Rash.
- Manifestaciones hemorrágicas
- Leucopenia; y
- Soporte serológico; u
- Ocurrencia del caso en el mismo lugar y tiempo que otros casos confirmados de dengue.

En la definición de un caso de **dengue hemorrágico** deben de estar presentes todos los siguientes **cuatro criterios** ¹⁵:

1. Fiebre o historia de fiebre de 2 a 7 días de evolución, ocasionalmente bifásica.
2. Manifestaciones hemorrágicas, con la evidencia de al menos una de las siguientes:
 - a. Una prueba de torniquete positiva.
 - b. Presencia de petequias, equimosis o púrpura.
 - c. Sangrado de mucosas, tracto gastrointestinal u otro sitio.
3. Trombocitopenia (menor o igual a 100 000 células por mm³).
4. Evidencia de fuga plasmática debido a incremento de la permeabilidad vascular, manifestada por al menos una de las siguientes:
 - a. Aumento en el hematocrito igual o mayor del 20% por encima del promedio para edad, sexo y población.
 - b. Una caída en el hematocrito igual o mayor al 20% de la línea de base posterior a tratamiento de reemplazo de volumen.

- c. Signos de fuga plasmática tales como derrame pleural, ascitis e hipoproteinemia.

La definición para el **síndrome de choque por dengue** incluye la presencia de los cuatro criterios arriba mencionados más la evidencia de falla circulatoria, manifestada por ¹⁵:

- Pulso rápido y débil, y
- Estrechamiento o pinzamiento del pulso (<20mm Hg)

O manifestado por:

- Hipotensión para la edad, y
- Piel fría y sudorosa e inquietud.

Grados de severidad del Dengue hemorrágico.

El dengue hemorrágico se puede dividir o clasificar en cuatro grados de severidad (grados III y IV son los considerados como síndrome de choque por dengue) ¹⁵:

Grado I: fiebre acompañada por síntomas no específicos; la única manifestación hemorrágica es la prueba de torniquete positivo y/o la fácil aparición de moretones.

Grado II: presencia de sangrado espontáneo más el Grado I, usualmente a nivel de piel u otras hemorragias.

Grado III: Falla circulatoria manifestada por pulso rápido y débil, estrechamiento-pinzamiento de la presión del pulso o hipotensión, con la presencia de piel fría y sudorosa e inquietud.

Grado IV: choque profundo con presión de pulso indetectable.

Nueva propuesta de clasificación de severidad del Dengue³⁰.

Se ha propuesto una **nueva clasificación de severidad**; Dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue severo.

El *dengue sin signos de alarma* define de la siguiente manera:

- Vivir o haber viajado a una área endémica de dengue.
- Fiebre y la presencia de 2 ó más de los siguientes criterios:
 - Nauseas ó vómitos.
 - Rash.
 - Dolor o malestares.
 - Prueba de torniquete positivo.
 - Leucopenia
- Dengue confirmado por laboratorio.

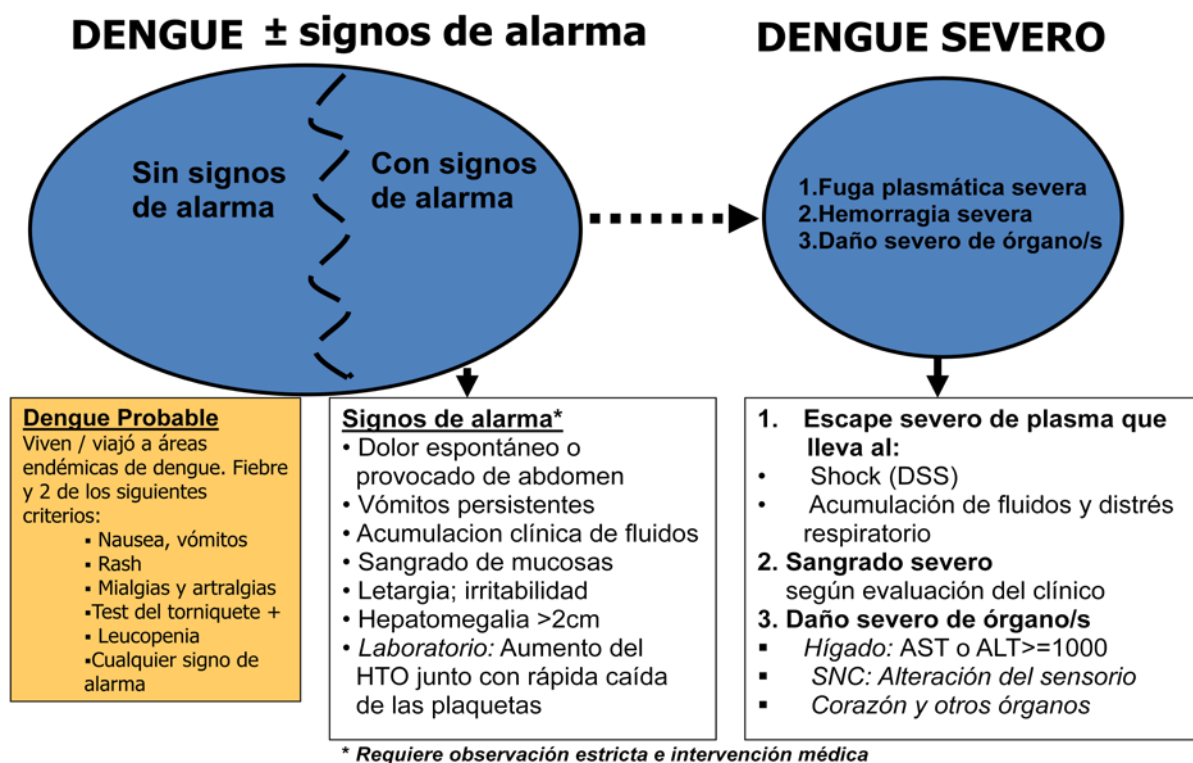
El *dengue con signos de alarma* corresponde a la definición de caso más la presencia de cualquiera de los siguientes signos de alarma:

- Dolor o sensibilidad abdominal.
- Vómitos persistentes.
- Acumulación clínica de líquido.
- Sangrado de mucosas.
- Letargia o irratibilidad.
- Hepatomegalia mayor de 2 cm.
- Laboratorio: incremento del hematocrito concurrente con el rápido descenso de las plaquetas.

La definición de un *dengue severo* está dada por la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

- Fuga plasmática severa que conlleva a:
 - o Choque.
 - o Acumulación de líquido con dificultad respiratoria.
- Sangrado severo (evaluado por el médico).
- Falla o daño severo de órganos:
 - o Hígado: AST o ALT mayor o igual de 1000.
 - o Sistema nervioso central: alteración o trastorno de la conciencia.
 - o Corazón y otros órganos.

Figura 2. Nueva clasificación propuesta para severidad del Dengue.³⁰



Fases del dengue.

1. Fase Febril. El paciente típicamente desarrolla fiebre alta de manera súbita. Esta fase febril aguda usualmente dura entre 2 a 7 días y a menudo es acompañada de rubor facial, eritema en piel, dolor de cuerpo, mialgia, artralgia y cefalea. Algunos pacientes pueden presentar inflamación de garganta, inyección faríngea e inyección conjuntival. La presencia de anorexia, náusea o vómito también es común. Puede ser difícil diferenciar clínicamente el dengue de otra enfermedad febril en esta fase. Una prueba de torniquete positiva en esta fase incrementa la posibilidad de dengue. Las manifestaciones clínicas de esta fase no distinguen los casos severos de los no severos. La monitorización de signos de alarma y de otros parámetros clínicos es crucial para reconocer la progresión hacia la fase crítica.

Manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de mucosas (nariz o encilla) pueden ser vistas en esta fase. Hemorragias masivas vaginales (en mujeres en edades fértil) y sangrado gastrointestinal también puede ocurrir durante esta fase, pero no es muy común. El hígado con frecuencia está aumentado de tamaño y sensible. Las alteraciones iniciales en la biometría hemática completa se presentan por un progresivo descenso de los leucocitos, lo que debe alertar al clínico a una alta probabilidad de dengue.

2. Fase crítica. Alrededor de la defervescencia, cuando la temperatura cae a los 37.5-38°C o menos y se mantiene por debajo de ese valor, usualmente entre el 3er y el 7mo día, puede suceder un incremento de la permeabilidad capilar en paralelo con el aumento en el valor del hematocrito. Esto marca el inicio de la fase crítica. El período clínicamente significativo de la fuga capilar usualmente dura de 24 a 48 horas.

Una progresiva leucopenia seguida por un rápido descenso del conteo plaquetario usualmente precede a la fuga plasmática. En este punto, los pacientes sin un incremento en la permeabilidad capilar mejorarán, mientras que aquellos con incremento en la permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida o fuga del volumen plasmático. El grado de fuga plasmática varía. La presencia de derrame pleural y de ascitis puede ser clínicamente detectable dependiendo del grado de fuga y del volumen de la terapia de líquidos intravenosos, es aquí donde la radiografía de tórax y el ultrasonido abdominal pueden ser útiles herramientas diagnósticas. El grado de incremento de hematocrito por encima de la línea de base o valor normal a menudo refleja la severidad de la fuga plasmática.

El choque ocurre cuando un volumen crítico de plasma se fuga. Esto es a menudo precedido por signos de alarma. La temperatura del cuerpo puede estar por debajo de lo normal cuando el choque ocurre. Con el choque prolongado hay una hipoperfusión en los órganos, lo que resulta en un daño o falla orgánica, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. Esto a su vez conlleva a una hemorragia severa causando así un descenso del hematocrito y a su vez en un choque severo. En lugar de la leucopenia que normalmente se observa durante esta fase del dengue, puede haber un aumento de los leucocitos en los pacientes con sangrado severo. Además el daño severo a órganos, tales como hepatitis severa, encefalitis o miocarditis y/o hemorragia severa también puede ocurrir sin fuga plasmática obvia o choque.

Aquellos pacientes que mejoran después de la defervescencia se dice que tienen dengue no severo. Algunos pacientes progresan a la fase crítica de fuga plasmática sin la defervescencia, y en estos pacientes, los cambios en la biometría hemática completa deben de ser usados para guiar el inicio de la fase crítica y la de la fuga plasmática.

Aquellos pacientes que se deterioran se manifestarán con signos de alarma. Los casos de dengue con signos de alarma probablemente mejorarán con rehidratación intravenosa temprana. Algunos casos evolucionarán a dengue severo.

3. Fase de recuperación o convalecencia. Si el paciente sobrevive 24-48 horas de la fase crítica sucede una gradual reabsorción de los líquidos del espacio extravascular en las siguientes 48 -72 horas. El estado general del paciente mejora, regresa el apetito, disminuyen los síntomas gastrointestinales, el estatus hemodinámico se estabiliza y la diuresis vuelve a la normalidad. Algunos pacientes pueden presentar un rash de islas blancas en mar rojo. Algunos experimentan un prurito generalizado. Bradicardia y cambios electrocardiográficos son comunes en esta fase.

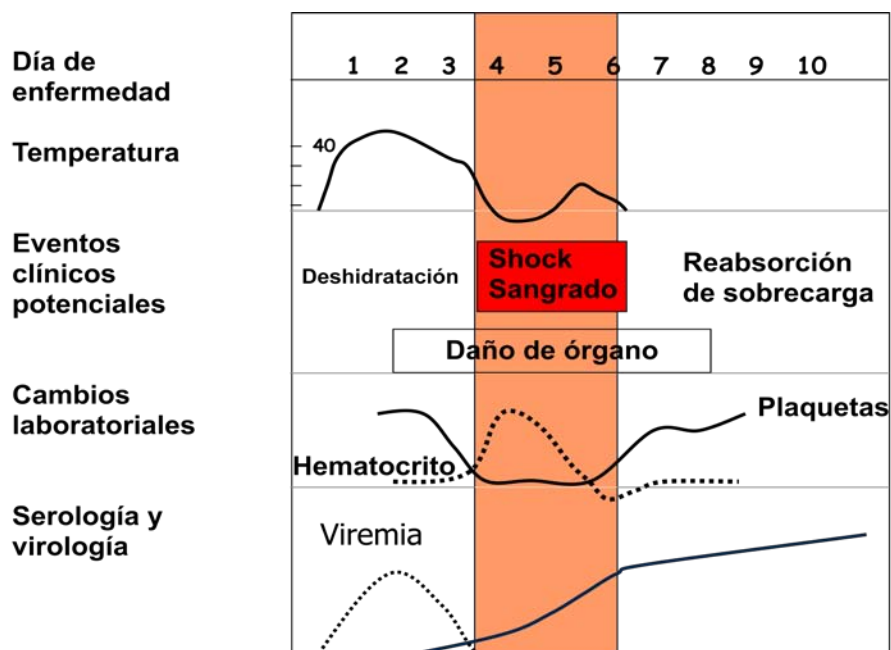
El hematocrito se estabiliza o puede estar un poco bajo de lo normal debido al efecto de dilución por la reabsorción de fluidos. El conteo de leucocitos usualmente comienza a incrementarse inmediatamente después de la defervescencia, pero la recuperación del conteo plaquetario ocurre después que el de los leucocitos.

La dificultad respiratoria debido a un derrame pleural masivo o ascitis ocurrirá en cualquier momento si los fluidos intravenosos fueron administrados excesivamente. Durante la fase

crítica y/o la fase de recuperación o convalecencia, la terapia intravenosa excesiva está asociada con edema pulmonar o falla cardíaca congestiva.

1	Fase febril	Deshidratación; la fiebre alta puede causar alteraciones neurológicas y convulsiones febriles en niños pequeños.
2	Fase crítica	Choque debido a fuga plasmática; hemorragia severa; falla de órganos.
3	Fase de recuperación o convalecencia	Hipervolemia (sólo si la terapia de líquidos intravenosos fue excesiva o se extendió a este período).

Figura 1. Curso de la enfermedad del dengue*.



Curso de la enfermedad: Fase febril Fase crítica Fase de recuperación

*Adaptado de WCL Yip, 1980 por Hung NT, Lum LCS, Tan LH.

Dengue severo. La clasificación del dengue severo está definida por la presencia de uno o más de los siguientes criterios: fuga de plasma (que conlleva a choque o que produce dificultad respiratoria), sangrado severo y/o daño/falla importante de órganos. A medida que la permeabilidad vascular progresa, la hipovolemia empeora y produce choque. Normalmente esto se produce entre 4to y 5to día (rango de 3er a 7mo día) de la enfermedad y es precedido

por signos de alarma. Durante la etapa inicial del choque, mecanismos compensatorios que mantienen normal el valor de la presión arterial sistólica también producen taquicardia y vasoconstricción periférica lo que reduce la perfusión a nivel de piel, resultando de esta manera la presencia de frialdad distal y retraso en el llenado capilar. Durante esta etapa solamente la presión diastólica tiende a subir (acercándose más al valor de la sistólica) y la presión del pulso se estrecha a medida que aumenta la resistencia vascular periférica. Los pacientes con choque a medida permanecen conscientes y lúcidos. La inexperiencia del clínico puede medir una presión sistólica normal y mal juzgar el estado crítico del paciente. Finalmente hay una descompensación y ambas presiones (sistólica y diastólica) desaparecen de manera abrupta. El choque hipotensivo prolongado y la hipoxia pueden conllevar a una falla multiorgánica y a un curso clínico extremadamente difícil.

Se considera que un paciente tiene choque si la presión de pulso (ejemplo: la diferencia de presión entre la sistólica y diastólica) es menor o igual a 20mm Hg en niños o si tiene signos de mala perfusión capilar (frialdad distal, retraso del llenado capilar o pulso rápido). La hipotensión usualmente está asociada con el choque prolongado el cual a menudo está complicado por un mayor sangrado (hemorragia).

Pacientes con dengue severo pueden tener anomalías de la coagulación, pero no es suficiente para causar un mayor sangrado (hemorragia). Cuando los problemas de sangrado ocurren, casi siempre están asociados con choque profundo, el cual en combinación con trombocitopenia, hipoxia y acidosis pueden conllevar a falla multiorgánica y a una coagulación intravascular diseminada. Una hemorragia masiva puede ocurrir sin choque prolongado en situaciones cuando se ha administrado ácido acetil salicílico, ibuprofeno o corticoesteroides.

Manifestaciones poco comunes, incluyendo falla hepática aguda y encefalopatía, pueden estar presente, aún en la ausencia de fuga plasmática severa o choque. Cardiomiopatía y encefalitis también han sido reportadas en algunos casos con dengue. Sin embargo, la mayoría de las muertes en los pacientes con dengue ocurren con choque profundo, particularmente si la situación es complicada por sobrecarga de líquidos intravenosos.

El dengue severo debe de ser considerado si el paciente es de un área de riesgo y que presenta fiebre de 2 a 7 días más cualquiera de los siguientes criterios:

- Evidencia de fuga plasmática:

- o Un alto o progresivo aumento del hematocrito.
- o Derrame pleural o ascitis.
- o Compromiso circulatorio o choque (taquicardia, extremidades frías y sudorosas, llenado capilar mayor de 3 segundos, pulso débil o indetectable, pinzamiento o presión arterial irrecuperable).
- Hemorragia significativa.
- Alteración de la conciencia (letargia, inquietud, coma, convulsiones).
- Manifestaciones gastrointestinales severas (vómito persistente, dolor abdominal en incremento o intenso, ictericia).
- Falla orgánica severa (falla hepática aguda, falla renal aguda, encefalopatía o encefalitis u otra inusual manifestación, cardiomiopatía).

Abordaje hemodinámico. Proceso continuo de cambios hemodinámicos.³⁰

Parámetros	Circulación estable	Choque compensado	Choque hipotensivo
Estado de conciencia	Claro y lúcido	Claro y lúcido (el choque puede pasar desapercibido si no se examina al paciente)	Cambio del estado mental (inquietud)
Tiempo de llenado capilar	Menor de 2 segundos	Prolongado (mayor de 2 segundos)	Muy prolongado, piel moteada
Extremidades	Cálidas y rosadas	Frialdad periférica	Frías y sudorosas
Pulso periférico	Fuerte	Débil, filiforme	Débil o ausente
Frecuencia cardíaca	Normal para edad	Taquicardia	Taquicardia severa. Bradicardia en choque tardío
Presión arterial	Normal para edad. Presión de pulso normal para edad.	Presión sistólica normal pero con presión diastólica aumentando produciendo estrechamiento de la presión. Hipotensión postural	Estrechamiento de presión de pulso (<20mmHg). Hipotensión* Presión arterial irrecuperable
Frecuencia respiratoria	Normal para la edad	Taquipnea	Acidosis metabólica, hiperpnea, respiración de Kussmaul

*Hipotensión se define como: presión arterial sistólica <90mmHg o promedio de presión arterial <70mmHg en adultos o un descenso de la presión arterial sistólica >40mmHg or <2 desviaciones estándar por debajo de lo normal para la edad. En niños hasta 10 años de edad, el 5to centil para la presión sistólica arterial puede ser determinada por la fórmula: $70 + (\text{edad en años} \times 2) \text{ mmHg}$.

Confirmación por laboratorio de las infecciones por dengue.

a. Aislamiento viral: cuatro sistemas de aislamiento han sido usados rutinariamente para el aislamiento de virus dengue: inoculación intracerebral de ratón recién nacido, el uso de cultivos celulares de mamíferos (principalmente células LLC-MK2), inoculación intratorácica de mosquitos adultos, y el uso de líneas celulares de mosquitos³¹. Los virus del dengue pueden ser aislados de suero, plasma, y leucocitos en casi todos los pacientes febriles.

Los virus también pueden ser aislados en especímenes de tejidos post-mortem, por ejemplo: hígado, pulmones, bazo, ganglios linfáticos, timo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o ascítico¹⁵.

La línea celular más ampliamente utilizada es la C6/C36 de *A. Albopictus*. El uso de líneas celulares ha proveído un método rápido, sensible y económico para el aislamiento viral. Muchos especímenes de suero pueden ser procesados fácilmente, por lo que es el método ideal para vigilancia virológica de rutina. Sin embargo, el sistema es menos sensible que la inoculación de mosquitos, aunque también la sensibilidad de la línea celular puede variar con la cepa del virus.

El método de elección para la identificación del virus es inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos monoclonales. Es simple y rentable y es el método más rápido. Más allá permite detectar múltiples virus en pacientes con infecciones concurrentes con más de un serotipo.

b. Transcriptasa Inversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés): para el dengue el RT-PCR provee un rápido diagnóstico específico para cada serotipo. El método es rápido, sensible, simple y reproducible si es controlado apropiadamente y puede ser usado para detectar ARN en muestras clínicas humanas, tejidos de autopsia, o mosquitos. Aunque el RT-PCR tiene similar sensibilidad al sistema de aislamiento viral que usa cultivos celulares C6/C36, el pobre manejo u almacenamiento y la presencia de anticuerpos usualmente no influencia el resultado a como lo hacen con el aislamiento viral³¹.

La aplicación de esta técnica molecular ha sido aplicada en nuestro país desde aproximadamente 10 años, proveyendo información importante para caracterizar la dinámica de transmisión y para que las medidas de control puedan ser implementadas en un tiempo adecuado ³².

c. ELISA – Inhibición: es usado para diferenciar infecciones primarias y secundarias por dengue. La prueba es simple y fácil de realizar, pero no puede ser usada para identificar serotipo del virus. El diagnóstico serológico inequívoco depende en un incremento significativo (≥ 4 veces) en el título de anticuerpos específicos entre muestras de suero agudo y convaleciente ³¹. La interpretación de resultados de esta técnica se encuentra descrito en Manual de Procedimientos del Ministerio de Salud ³³.

METODOLOGÍA.

Tipo de estudio: cohorte prospectiva.

Población, lugar y período de estudio: La población de estudio estuvo conformada por un total de 544 pacientes con diagnóstico de dengue, siendo 332 pacientes durante el período 2005 al 2008 y 212 pacientes durante el año 2009.

El estudio se llevó a cabo en el hospital infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”. Este hospital está ubicado en el barrio La Fuente, en la ciudad de Managua, capital de Nicaragua. Es un hospital escuela de referencia nacional, tiene con un total de 246 camas censables. Entre las diferentes especialidades que ofrece, cuenta con el servicio de Infectología, el cual tiene un área de hospitalizaciones, con un total de 30 camas y un área de consulta externa. Dicho servicio es atendido por dos médicos pediatras infectólogos y un pediatra con experiencia en el manejo clínico del dengue.

Criterios de inclusión:

Niños entre 6 meses de vida a 14 años.

Dengue confirmado por laboratorio a través de PCR en tiempo real, aislamiento viral y serología de sueros pareados.

Criterios de exclusión:

Pacientes con datos insuficientes para su correcta clasificación de severidad según los criterios de OMS y aquellos casos con resultado indeterminado para dengue a través de pruebas de laboratorio.

Factor de exposición / no exposición: se consideró cómo factor de exposición a los pacientes que presentaron dengue durante el año 2009 y como no exposición a los pacientes que presentaron dengue durante el período 2005-2008.

Evento a estudio y tiempo de seguimiento: en este estudio se estudió la presencia de 3 trastornos circulatorios (frialdad distal, mal llenado capilar y choque compensado), así como el tiempo de aparición en días de cada uno de ellos. El tiempo de seguimiento para observar la aparición del evento fue por un máximo de 10 días.

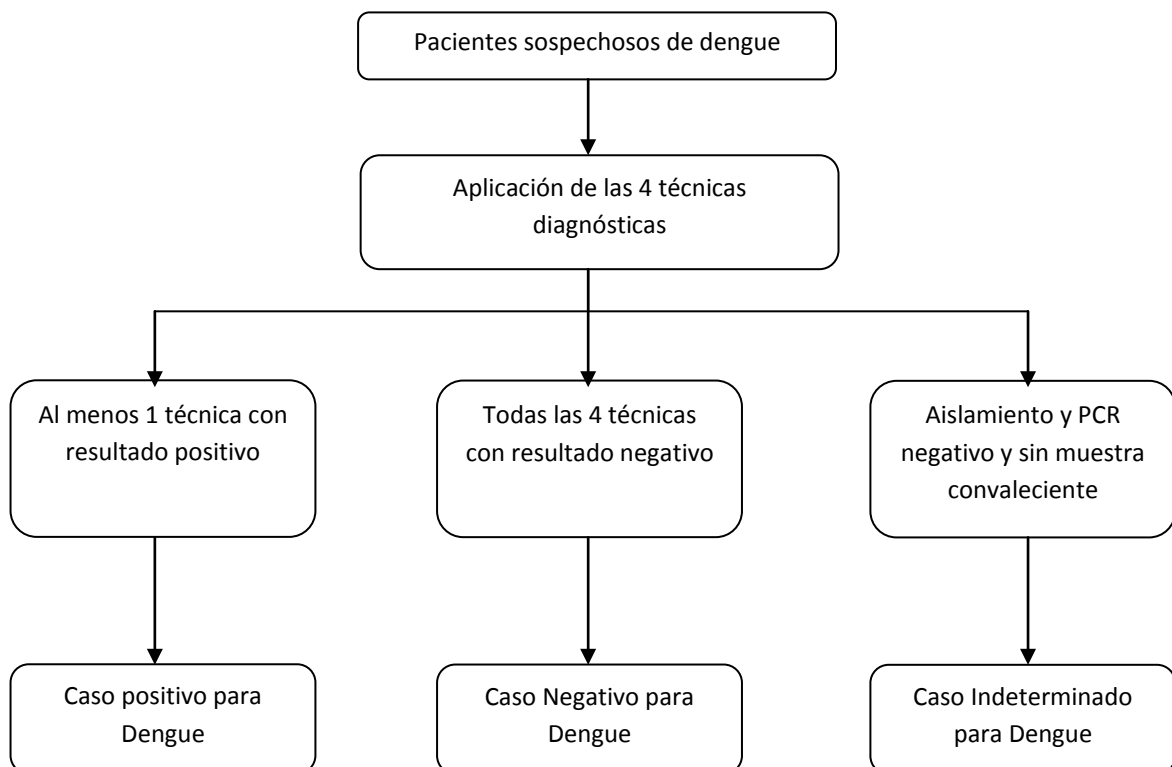
Fuente y procesamiento de la información. La información fue de tipo secundaria, obtenida mediante los registros del Estudio Hospitalario prospectivo de clasificación, manejo y diagnóstico de casos de dengue en Nicaragua.

Estudio Hospitalario prospectivo de clasificación, manejo y diagnóstico de casos de dengue en Nicaragua: desde el año 2005 se lleva a cabo en el hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera un estudio sobre dengue. En dicho estudio se recopila información clínica, manejo y tratamiento de los pacientes con cuadro clínico de dengue. Es invitado a participar todo paciente que cumpla con la definición de caso sospechoso de dengue entre las edades de 6 meses y los 14 años con un peso no menor de 8 kg. Una vez que al paciente y al tutor se le explica el estudio y acepta participar se le pide al tutor legal del paciente firmar un consentimiento informado y se solicita también un asentimiento verbal a los niños mayores de 5 años y un asentimiento escrito a los niños mayores de 12 años. Una vez cumplidos los requisitos de enrolamiento se inicia el proceso de recolección de información del paciente. Cada paciente ingresado al estudio es historiado y examinado exhaustivamente por un médico pediatra Infectólogo durante el tiempo que permanece hospitalizado o en su cita en la consulta externa en caso de manejo ambulatorio. Toda la información recolectada (datos generales, historia clínica, evolución diaria del paciente, datos de laboratorio y resumen de alta) es supervisada por un segundo médico pediatra y luego monitoreada por un oficial de control de calidad. Luego el expediente es llevado a digitación, donde es ingresado a una base de datos de Access a través de doble entrada de datos y posteriormente se hace un check de las bases de datos para corregir probables errores de digitación. A todo paciente del estudio se le toman al menos 3 muestras de sangre en su etapa aguda (primeros 6 días de la enfermedad) y una muestra en la etapa de convalecencia (14 días después del inicio de la enfermedad). A través de estas muestras se realiza el diagnóstico del dengue ya sea por uno de los siguientes métodos: aislamiento viral, PCR en tiempo real para dengue, serología (sueros pareados). La detección de la respuesta inmune se realiza a través de la titulación de anticuerpos de la muestra aguda y de la muestra convaleciente. La clasificación de severidad de los pacientes se hace a través de un algoritmo basado de manera estricta en los criterios de severidad de OMS. Para cada paciente el algoritmo genera la clasificación tradicional (fiebre del dengue, dengue hemorrágico, síndrome de shock por dengue) y la nueva propuesta de clasificación (dengue sin datos de alarma, dengue con datos de alarma y dengue severo).

Diagnóstico de casos de dengue. La confirmación o diagnóstico de casos de dengue se realizó a través de pruebas de laboratorio. A cada paciente se le realizaron las siguientes pruebas o técnicas de laboratorio:

- Aislamiento del virus del dengue.
- Detección de ARN del virus del dengue a través de PCR en tiempo real.
- Seroconversión de IgM específica para Denv detectado por MAC-ELISA en muestras pareadas (aguda y convaleciente).
- Elevación o incremento de 4 veces o más de los títulos de anticuerpo de una muestra convaleciente en comparación a la muestra aguda a través inhibición de ELISA.

Para considerar positivo para dengue a un paciente se debían de obtener el resultado de cada una de las pruebas, si al menos en una de ellas el resultado era positivo entonces se consideró como caso positivo para dengue. Un caso negativo fue aquel en donde cada una de las pruebas dio resultado negativo. Un caso indeterminado fue aquel en donde el resultado por aislamiento viral y detección de ARN del virus del dengue a través del PCR en tiempo real dio como resultado negativo, pero no se pudo obtener una muestra en la fase de convalecencia de la enfermedad para realizar pruebas de serología en sueros pareados.



Respuesta Inmune: La determinación de la respuesta primaria o secundaria se determinó a través de los niveles de títulos de anticuerpos para dengue en muestras pareadas. Se consideró una *respuesta inmune primaria* cuando los valores de anticuerpos en la muestra tomada en la fase aguda de la enfermedad (primeros 6 días de la enfermedad) eran menores a 10 o cuando los valores de anticuerpos eran menores de 2,560 en la muestra tomada en la fase convaleciente de la enfermedad. Se consideró una respuesta inmune secundaria cuando los valores de anticuerpos eran de 10 ó más en las muestras tomadas en la fase aguda de la enfermedad o valores de anticuerpos iguales o mayores de 2,560 en las muestras tomadas en la fase convaleciente de la enfermedad. Esto se realizó a través de la técnica de inhibición de ELISA.

Plan de análisis. Se reportaron resultados comparando el período 2005-2008 vs el período 2009. Las variables cualitativas tales como; sexo, manejo, serotipo, respuesta inmune, clasificación de severidad, mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado fueron expresadas en frecuencias relativas y absolutas. Se utilizaron estadísticas descriptivas de tendencia central (mediana, promedio) y de dispersión (rango intercuartílico) para las variables cuantitativas tales como; edad y sobrevida de los trastornos circulatorios.

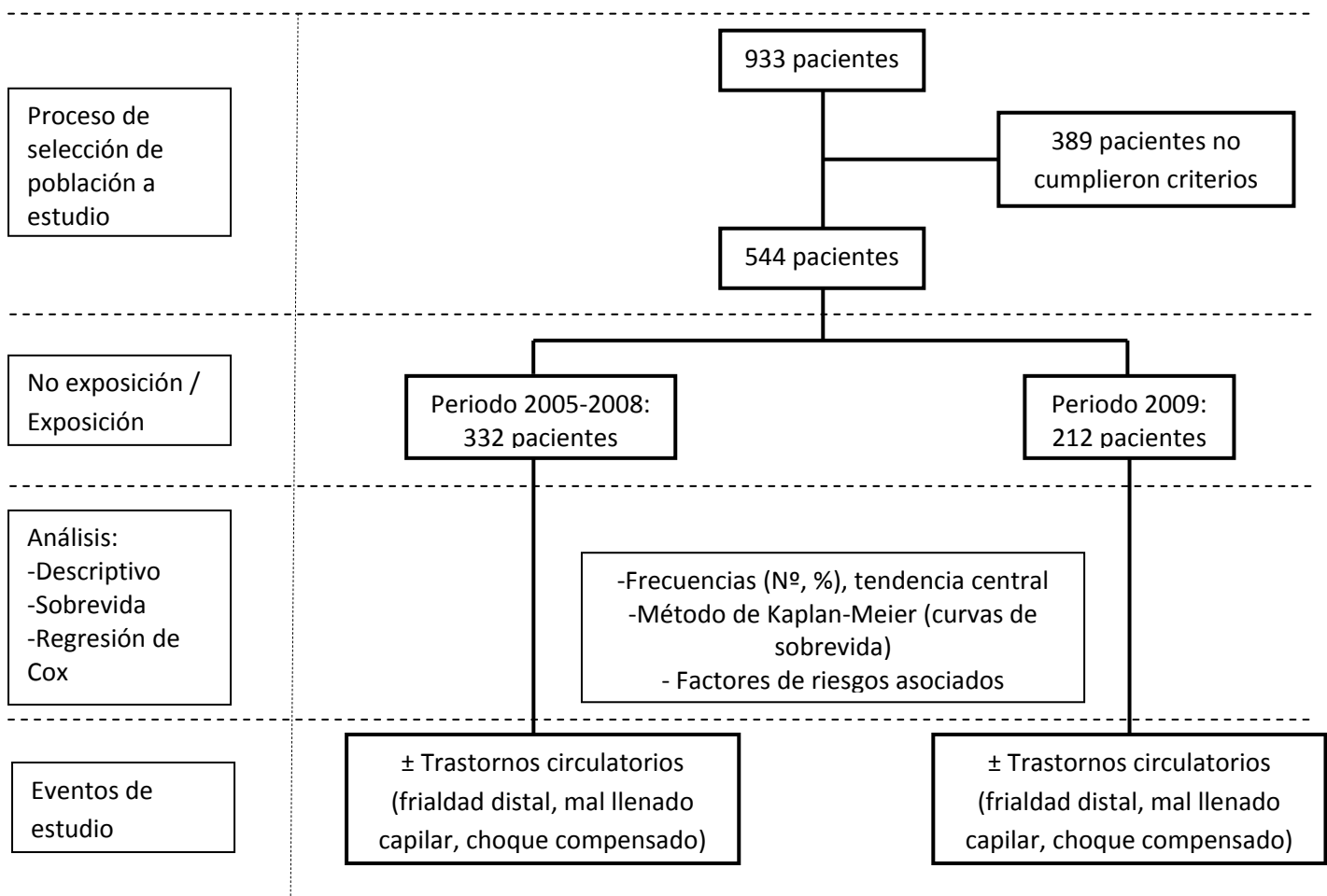
Para la comparación de datos cuantitativos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney debido a la distribución no normal de los datos. Para la comparación de datos cualitativos se usó la prueba de chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando sea necesario (valor esperado menor de 5 de la frecuencia del evento).

El cálculo de la sobrevida de trastornos circulatorios por temporada de estudio (período 2005-2008 vs período 2009) se realizó a través del método de Kaplan-Meier. Se utilizó la prueba de Long-Rank para determinar si hubo diferencia significativa al comparar 2 curvas de sobrevida.

A través de un análisis de regresión de Cox multivariado se investigaron los factores de riesgo asociados al tiempo de aparición de los eventos en estudio (mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado). Esta asociación se midió utilizando la razón de riesgo (haz ratio) con su respectivo intervalo de confianza del 95%. En el caso de la respuesta inmune secundaria como factor de riesgo sólo se incluyeron los pacientes iguales o mayores de 1 año de edad para evitar la influencia que tienen los anticuerpos maternos contra el

dengue (obtenidos a través de lactancia materna en este grupo de edad). Se crearon variables ficticias o variables de referencias (variables Dummy) para los serotipos y se excluyó el único caso de co-infección de Denv3 & Denv4.

Para evitar el efecto que pudo causar el hecho de asistir tempranamente (primeros 3 días de la enfermedad) a la unidad de salud en comparación con asistir tardíamente (posterior al 3er día de la enfermedad), el análisis multivariado se hizo ajustado al ingreso temprano a la unidad hospitalaria (en los 3 primeros días de la enfermedad). Se trabajó con un nivel de confianza del 95% y se consideró significancia cuando el valor de p fue menor de 0.05. Todos los datos se analizaron con el programa estadístico Intercooled Stata versión 9.0 (StataCorp LP, College Station, Texas).



Operacionalización de Variables.

Variable	Concepto	Indicador	Escala/categoría
Sexo	Características fenotípicas que diferencian al hombre de la mujer	Base de datos	Hombre Mujer
Edad	Años cumplidos desde la fecha de nacimiento hasta el momento del estudio	Base de datos	Numérica continua ≥8 años/<8 años
Mal llenado capilar	Tiempo mayor de 2 segundos del llenado a nivel de capilares	Base de datos	Si No/censor ^a
Frialdad distal	Temperatura por nivel inferior de lo normal a nivel de las extremidades del paciente	Base de datos	Si No/censor
Choque compensado	Presencia de mal llenado capilar y 1 ó más de los siguientes signos: pulso débil, frialdad distal, taquicardia, taquipnea.	Base de datos	Si No/censor
Serotipo de virus del dengue	Tipo de serotipo encontrado en pruebas de laboratorio de cada paciente	Base de datos	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4
Período	Año calendario de estudio de los pacientes con dengue	Base de datos	2009 2005-2008
Ingreso temprano a hospital	Cuando el paciente es ingresado al hospital en los 3 primeros días de su enfermedad. Se calcula: (Fecha de llegada a hospital – fecha de inicio de síntomas) +1.	Base de datos	Si No
Clasificación tradicional de severidad según OMS	Grados de severidad basado en la los criterios de OMS según el cuadro clínico y datos de laboratorio del paciente en el transcurso de la enfermedad	Base de datos	Dengue clásico Dengue hemorrágico
Nueva clasificación propuesta de severidad	Grado de severidad basados en criterios propuesto por OMS según las manifestaciones clínicas y de laboratorio del paciente en el transcurso de la enfermedad.	Base de datos	Sin alarma Con alarma Severo
Respuesta inmune	Valores de títulos de anticuerpo que indican si es la infección por dengue ocurre por primera o segunda vez.	Base de datos	Primaria Secundaria
Sobrevida de mal llenado capilar	Tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad hasta la aparición de mal llenado capilar	Base de datos	Días
Sobrevida de frialdad distal	Tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad hasta la aparición de choque compensado	Base de datos	Días
Sobrevida de choque compensado	Tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad hasta la aparición de choque compensado	Base de datos	Días

^aCensor: pacientes en los que no se logró los 10 días de seguimiento establecidos y/o no se determinó si presentaron algún tipo de trastorno circulatorio.

Consideraciones éticas. La presente tesis es parte del estudio hospitalario prospectivo de la clasificación y manejo de casos de Dengue en Nicaragua, el cual está aprobado por el Comité Institucional de Revisión Ética (CIRE) del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua, registrado con el código # NIC-MINSA/CNDR CIRE-01/10/06-13.4. El investigador principal del estudio es la Dra. Eva Harris, PhD, profesora asociada de la escuela de salud pública de la universidad de Berkeley en California, Estados Unidos de América y el coordinador del estudio es el Dr. Ángel Balmaseda, PhD, quién es el director del departamento de virología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) del Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSA). El estudio hospitalario prospectivo ha sido financiado por Tropical Diseases Research de la Organización Mundial de la Salud (TDR/OMS). El autor de la tesis ha realizado el curso de capacitación del NIH (National Institute of Health) sobre “Protección de los participantes humanos de la investigación” (certificación #311586). En esta tesis se respetó la confidencialidad de los pacientes y fue exclusivamente con fines docentes y no con fines de lucro.

RESULTADOS.

Generalidades. Se estudiaron un total de 544 pacientes durante los períodos establecidos, 332 casos en el período 2005-2008 y 212 casos para el período 2009. Se observó que el sexo se distribuyó de manera uniforme en ambos períodos (chi cuadrado = 0.0000, $p = 1.000$). Se encontró también que la edad tuvo un comportamiento similar en ambos períodos (U de Mann-Whitney=0.147, $p=0.883$), variando entre los 6 meses de vida hasta los 14 años de edad para los dos períodos, con una mediana (rango intercuartílico) de 8.4 años (RI 4.8 – 11.5 años) para el 2005-2008 y 8.6 años (RI 5.2 – 10.8) en el 2009. No se observó diferencia significativa en la proporción de pacientes manejados de manera intrahospitalaria cuando se compararon ambos períodos (chi cuadrado=1.597, $p = 0.206$). (Ver tabla 1)

Tabla 1. Características Generales de pacientes con dengue. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR). 2005 – 2009.

Características Generales		Períodos de estudio		Valor de p^a
		2005-2008 N= 332	2009 N= 212	
Sexo	N (%)			
	Femenino	166 (50)	106 (50)	1.000
	Masculino	166 (50)	106 (50)	
Edad en años ^b		8.4 (4.8 – 11.5)	8.6 (5.2– 10.8)	0.883 ^c
Manejo	N (%)			
	Ambulatorio	59 (17.8)	29 (13.7)	0.206
	Intrahospitalario	273 (82.2)	183 (86.3)	
Serotipo ^d	N (%)			
	Denv-1	35 (11.8)	10 (5.1)	0.000
	Denv-2	150 (50.5)	11 (5.6)	
	Denv-3	112 (37.7)	175 (88.8)	
	Denv-3 & -4	0	1 (0.5)	
Respuesta inmune ^e	N (%)			
	Primaria	109 (34.1)	107 (52.2)	0.000
	Secundaria	211 (65.9)	98 (47.8)	

^aSe compara período 2005-2008 vs 2009 con la prueba de χ^2 .

^bSe reporta valor de mediana y rango intercuartílico.

^cValor de p de prueba U de Mann-Whitney.

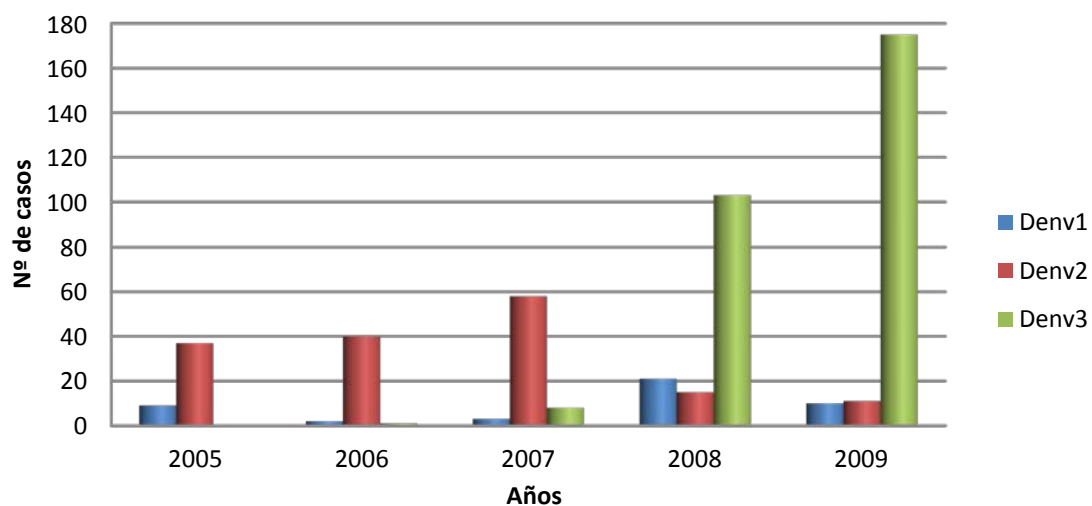
^dSe identificaron serotipos en 297 casos para el 2008-2009 y en 197 para el período 2009.

^eSe determinó la respuesta inmune en 320 casos para el 2005-2008 y para 205 casos en el 2009.

Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue HIJMR.

El serotipo que predominó durante el período 2005-2008 fue el Denv2 (50.5%), en cambio durante el período 2009 el Denv-3 fue el más frecuente (88.8%), esta diferencia observada en la frecuencia de serotipos en ambos períodos fue significativa (prueba exacta de Fisher = 0.000). Es importante señalar que desde el período 2005 al 2007 había un completo predominio del Denv-2 y a partir del 2007 reaparece el Denv-3, siendo predominante a partir del 2008 (Figura 1). Una secuencia completa del genoma del Denv-3 del periodo 2008 y 45 Denv-3 del periodo 2009 mostró, a través de un análisis filogenético, que no hubo cambios del virus (Figura 9 en anexos). La respuesta inmune (primaria o secundaria) se logró determinar en un total de 525 pacientes de los 544. Los 19 pacientes faltantes no se logró obtener una muestra en el período de convalecencia que permitiera determinar la respuesta inmune a través de la titulación de anticuerpos. Los pacientes con respuesta inmune secundaria se observaron con mayor frecuencia en el período 2005-2008 que en el periodo 2009 ($\chi^2=16.965$, $p = 0.000$). (Ver tabla 1).

Figura 1. Frecuencia de serotipos según años de estudio. HIMJR. 2005 - 2009.



Fuente: Base de datos estudio clínico de dengue

Clasificación de severidad. La proporción de casos severos (dengue hemorrágico), según la clasificación de severidad tradicional de OMS, en el período estudiado del 2005-2008 fue de un 38.9%, siendo significativamente mayor ($\chi^2=38.173$, $p=0.000$) al periodo 2009 (14.1%). Sin embargo, al utilizar la nueva clasificación de severidad de OMS para los pacientes con Dengue, se observó un panorama diferente que describe de manera más real la epidemia de dengue del 2009. Con la nueva clasificación se observó que aumentó, no solamente la proporción de casos severos en ambos períodos de estudio (40.7% en el 2005-2008 y 50.5% en el período 2009), sino también que los casos severos fueron significativamente mayor en el período del 2009 ($\chi^2 = 5.040$, $p = 0.025$). (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de severidad en pacientes con dengue. 2005-2009. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

Clasificación de severidad del dengue según OMS	Períodos de estudio		Valor de p ^a
	2005- 2008	2009	
	N = 332	N = 212	
<i>Clasificación Tradicional N (%)</i>			
No severos (Dengue clásico)	203 (61.1)	182 (85.9)	0.000
Severos (Dengue hemorrágico)	129 (38.9)	30 (14.1)	
<i>Nueva clasificación N (%)</i>			
No severos (Dengue sin/con datos de alarma)	197 (59.3)	105 (49.5)	0.025
Severo	135 (40.7)	107 (50.5)	

^a Prueba de χ^2 para comparar 2005-2008 vs 2009.

Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue HIMJR.

Trastornos circulatorios: Análisis Descriptivo.

Mal llenado capilar. Se observó que la presencia de los pacientes con mal llenado capilar fue mayor durante el periodo 2009 en comparación al periodo 2005-2008, 44% vs 26%, respectivamente (χ^2 cuadrada = 19.165, $p=0.000$). Además de una mayor frecuencia de este trastorno durante el 2009, éste mismo apareció de manera más temprana, en comparación con el período previo, al 3er día de la enfermedad aproximadamente el 50% de los casos con dengue ya presentaban la presencia de este trastorno, en cambio en el 2005-2008 al 3er día de la enfermedad solamente se había presentado el 4.6% de casos con mal llenado capilar (Figura 2). Se determinó que el día aparición de mal llenado capilar en el 2009 varió entre el 1er y 8vo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 3er día (RI 2do – 4to día), en cambio en el 2005-2008 el día de aparición de mal llenado capilar varió entre el 2do y el 7mo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 5to día (RI 4to – 6to día). Esta diferencia de 2 días observada en la aparición de este trastorno al comparar los períodos fue significativa (U de Mann-Whitney = 7.989, $p= 0.0000$). (Ver tabla 3)

Tabla 3. Frecuencia y día de enfermedad de aparición de trastornos circulatorios en pacientes con dengue. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

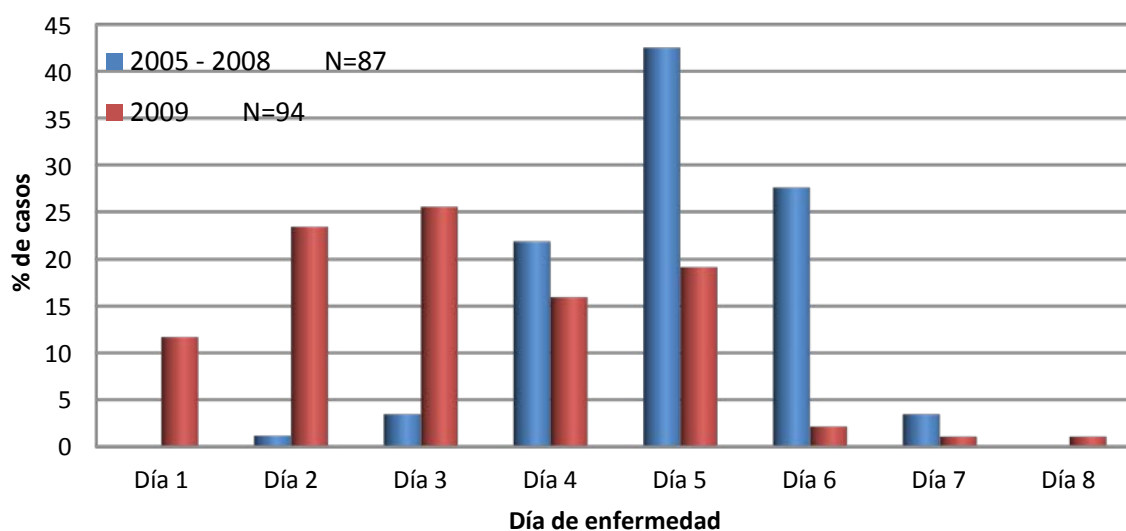
con dengue. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).			
Trastornos circulatorios	Períodos de estudio		Valor de p
	2005-2008 N = 332	2009 N = 212	
<i>Mal llenado capilar</i>			
Casos N (%)	87 (26)	94 (44)	0.000 ^a
Día de aparición ^b	5 (4 – 6)	3 (2 – 4)	0.000
<i>Frialdad Distal</i>			
Casos N (%)	123 (37)	118 (56)	0.000 ^a
Día de aparición ^b	5 (4 – 5)	3 (2 – 4)	0.000
<i>Choque compensado</i>			
Casos N (%)	82 (25)	90 (43)	0.000 ^a
Día de aparición ^b	5 (4 – 6)	3 (2 – 4)	0.000

^aValor de p de prueba de χ^2 al comparar período 2005-2008 vs período 2009.

^b Se reporta la mediana y rango intercuartílico del día de enfermedad de aparición y valor de p de prueba de Mann-Whitney.

Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue.

Figura 2. Frecuencia de casos con mal llenado capilar en pacientes con Dengue según día de enfermedad. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR). Período 2005-2008 vs 2009.

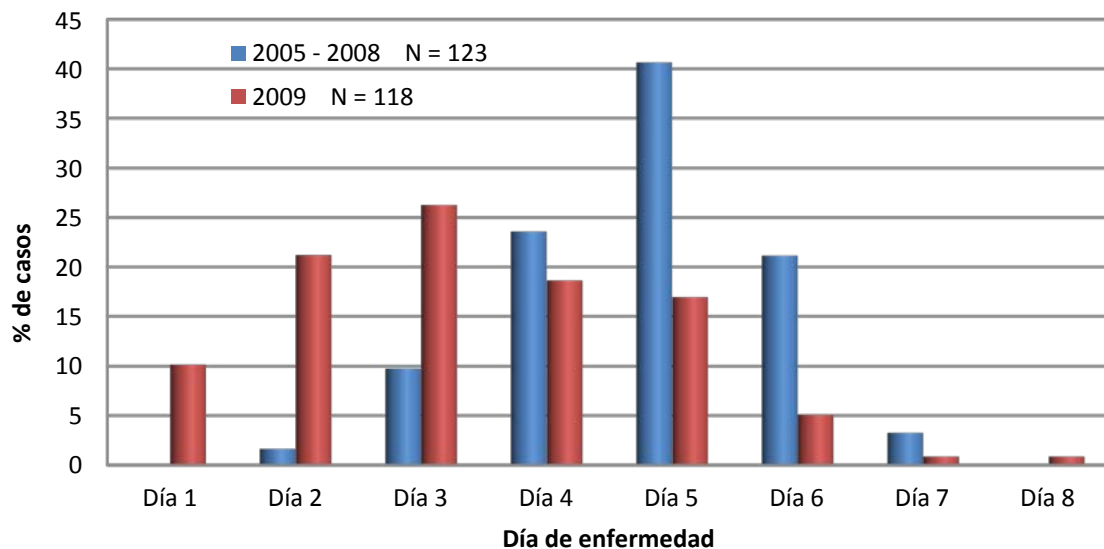


Fuente: Base de datos de estudio clínico.

Frialdad distal. En el período 2009 se encontró que un poco más de la mitad (56%) de los pacientes presentó este evento, en comparación con el período 2005-2008, donde la proporción de casos fue de un 37%; esta diferencia fue significativa (chi cuadrada= 18.163, $p = 0.000$). En cuanto al día de aparición, al igual que se comportó el mal llenado capilar, un poco más del 50% de los casos habían presentado la presencia de frialdad distal en los tres primeros días de la enfermedad durante el 2009, en cambio durante el período 2005 – 2008 la mayoría de los casos iniciaron a presentarse a partir del cuarto día (ver Figura 3).

El día de aparición de casos con frialdad distal durante el período 2009 varió entre 1er y el 8vo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 3er día (2do – 4to día). Durante el período del 2005 al 2008 el día de aparición para este evento varió entre el 2do y el 7mo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 5to día (4to – 5to día). La diferencia observada del día de presentación entre ambos períodos fue significativa (U de Mann-Whitney =7.781, $p=0.0000$) (Ver tabla 3).

Figura 3. Frecuencia de casos con frialdad distal en pacientes con Dengue según período de estudio. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR). 2005-2008 vs 2009.

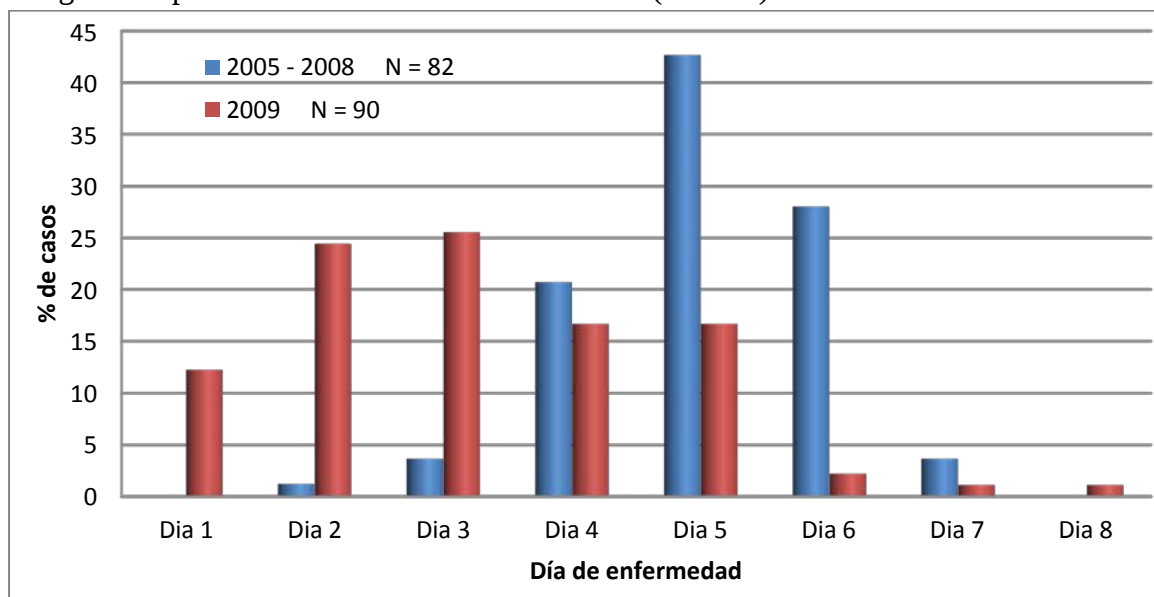


Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue.

Choque compensado. En el período 2009 la proporción de pacientes que tuvieron choque compensado (42%) fue significativamente mayor ($\chi^2 = 18.862$, $p = 0.000$) que el período 2005-2008 (25%). Se observó que en el 2009 hubo más casos de aparición de choque compensado durante los 3 primeros días de la enfermedad que en los años anteriores, en los cuales los casos de choque compensado iniciaron a presentarse mayormente a partir del 4to día (Figura 4).

La aparición de choque compensado durante el 2009 varió entre el 1er y el 8vo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 3er día (2do – 4to día). En cambio la aparición de choque compensado en el período del 2005 al 2008 varió entre el 2do al 7mo día de la enfermedad, con una mediana (rango intercuartílico) al 5to día (4to – 6to). Esta diferencia de 2 días entre los períodos comparados fue significativa (U de Mann-Whitney=8.008, $p=0.000$) (Tabla 3).

Figura 4. Frecuencia de aparición de casos con Choque compensado en pacientes con Dengue. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR). 2005-2008 vs 2009.



Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue.

Trastornos circulatorios en pacientes con Dengue: Análisis de sobrevida y determinación de factores de riesgo.

Análisis de sobrevida. A través del método de Kaplan-Meier se estimó que los pacientes con dengue durante el 2009 tuvieron una mayor probabilidad de presentar de manera más temprana la presencia de trastornos circulatorios en comparación a los pacientes del período 2005-2008 ($p < 0.001$) (Figura 5, Figura 6 y Figura 7). El promedio de sobrevida de mal llenado capilar durante el período 2009 fue de 6.9 días ($IC_{95\%} = 6.434 - 7.388$), siendo significativamente menor que en 2005-2008, en donde el promedio de vida fue de 8.7 días ($IC_{95\%} = 8.425-8.914$). En los casos de frialdad distal también se observó un comportamiento similar, el promedio de sobrevida en el 2009 fue significativamente menor que en el 2005-2008, 6.2 días ($IC_{95\%} 5.698 - 6.643$) vs. 8 días ($IC_{95\%} 7.756 - 8.319$) respectivamente. Este comportamiento también se presentó con los casos de choque compensado, en donde el promedio de sobrevida para este trastorno circulatorio durante el 2009 fue de 7 días ($IC_{95\%} 6.527 - 7.484$) y en el 2005-2008 fue de 8.7 días ($IC_{95\%} 8.510 - 8.988$), siendo esta diferencia también significativa (Ver tabla 5).

Tabla 5. Promedio de sobrevida de trastornos circulatorios en pacientes con dengue. 2005-2008 vs 2009. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

Trastornos circulatorios	Promedio y mediana de sobrevida en días			
	Promedio	IC 95%	Mediana ^a	IC 95% ^a
Mal llenado capilar				
Período 2005-2008	8.7	8.425 – 8.914	---	---
Período 2009	6.9	6.434 – 7.388	---	---
Frialdad distal				
Período 2005-2008	8	7.756 – 8.319	---	---
Período 2009	6.2	5.698 – 6.643	---	---
Choque compensado				
Período 2005-2008	8.7	8.510 – 8.988	---	---
Período 2009	7	6.527 – 7.484	---	---

^aEl cálculo de la mediana de sobrevida no se obtuvo debido a que la curva de la probabilidad no sobrepasa el 50%

Fuente: Base de datos de estudio clínico de dengue. HIMJR.

Figura 5. Sobrevida de Kaplan-Meier para mal llenado capilar en pacientes con dengue. 2005-2008 vs 2009. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

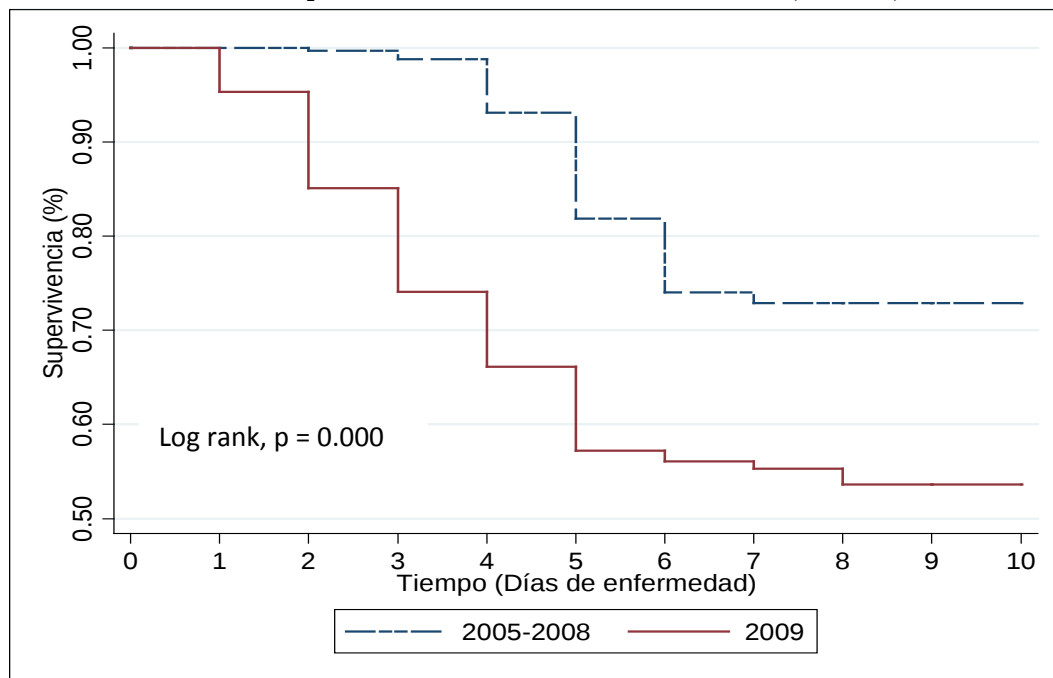


Figura 6. Sobrevida de Kaplan-Meier para Frialdad distal en pacientes con dengue. 2005-2008 vs 2009. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

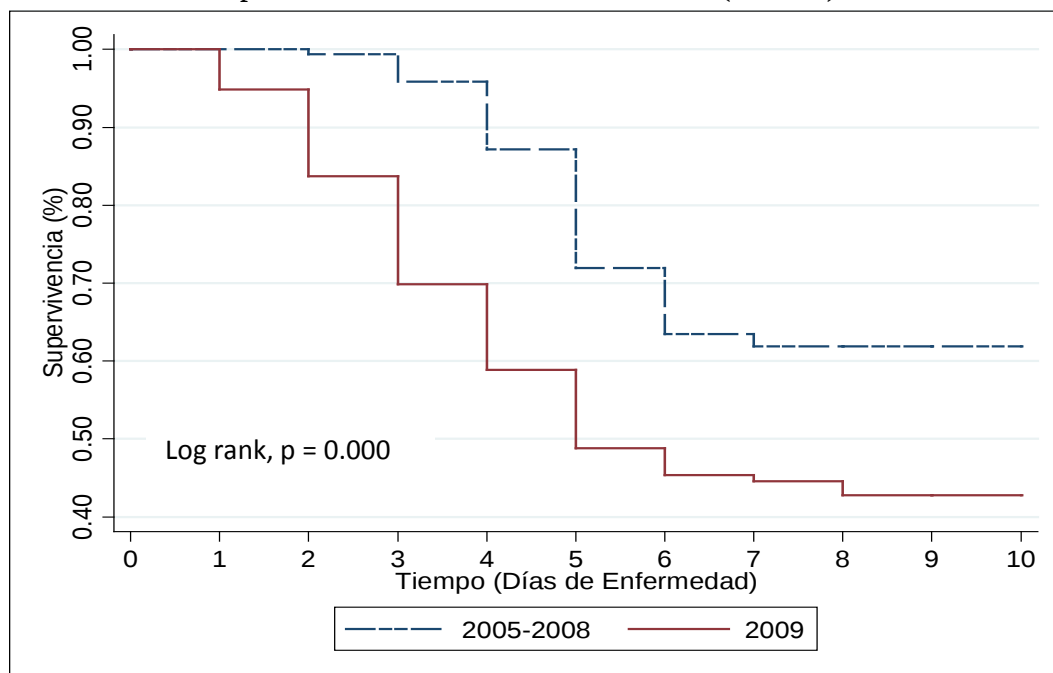
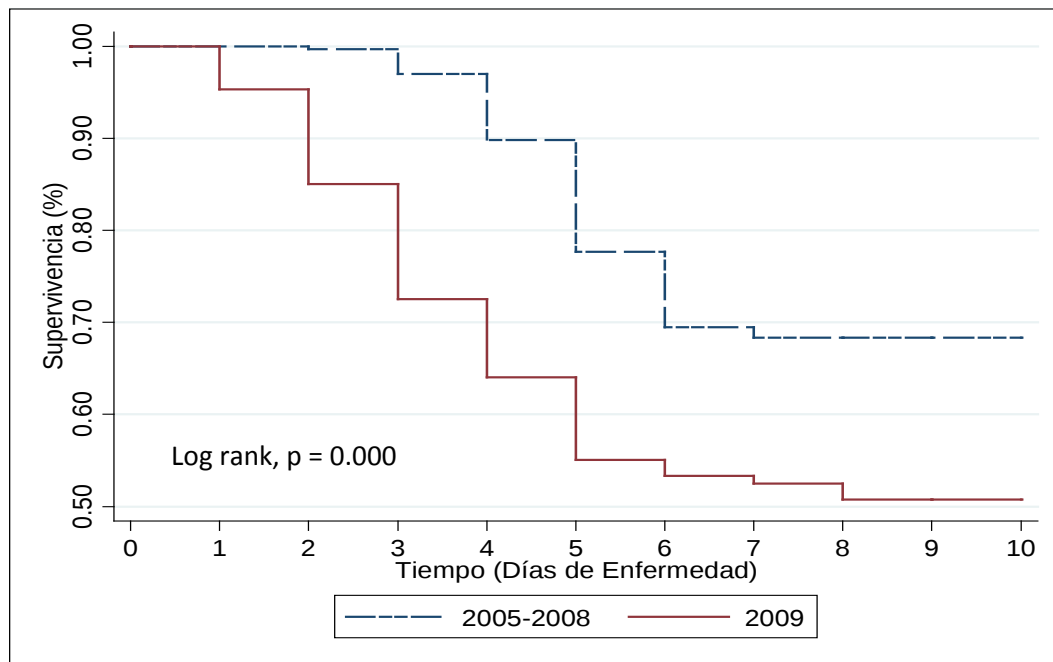


Figura 7. Sobrevida de Kaplan-Meier para Choque Compensado en pacientes con dengue. 2005-2008 vs 2009. Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).



Factores de riesgos. Para determinar los factores de riesgo a la aparición frecuente y más temprana de los trastornos circulatorios, se realizó un análisis multivariado de regresión de Cox. Para cada uno de los trastornos circulatorios se estudiaron la exposición a los períodos de estudio (2009 vs 2005-2008), serotipo (Denv-1, Denv-2, Denv-3), respuesta inmune (secundaria vs primaria), edad (Igual o mayor de 8 años vs menores de 8 años), el género (femenino vs masculino). Todas las variables eran ajustadas entre sí y con el ingreso temprano al hospital (en los primeros 3 días de la enfermedad).

Los pacientes expuestos al dengue durante el período 2009 tuvieron mayor riesgo (Haz. Ratio=2.80, IC95%= 1.856 – 4.238, $p=0.000$) de presentar **mal llenado capilar** de forma más frecuente y temprana que durante el 2005-2008, siendo éste el principal factor de riesgo. El denv1 (Haz ratio=1.90, IC95%= 1.106 – 3.288, $p=0.020$) y la respuesta inmune secundaria (Haz ratio=1.59, IC95%= 1.088 – 2.342, $p=0.017$) también fueron factores de riesgo asociados al comportamiento de este trastorno circulatorio. El Denv-2, la edad y el sexo no mostraron una asociación al evento en estudio ($p \geq 0.05$). (Tabla 6)

Tabla 6. Modelo multivariado de Regresión de Cox mal llenado capilar en pacientes con dengue. Ajustado por ingreso temprano (3 primeros días de la enfermedad). Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

Factores de riesgo		Haz ratio	Intervalo de confianza 95%	Valor de p
Período 2009		2.80	1.856 – 4.238	0.000
Serotipo	Denv-1	1.90	1.106 – 3.288	0.020
	Denv-2	1.34	0.857 – 2.121	0.195
	Denv-3	1	valor de referencia	---
Respuesta inmune secundaria		1.59	1.088 – 2.342	0.017
Igual o mayor de 8 años		1.10	0.779 – 1.560	0.581
Sexo	Femenino	0.93	0.678 – 1.289	0.684

Fuente: Base de estudio clínico de dengue.

En los casos con **frialdad distal**, se observó que los pacientes con dengue durante el 2009 tuvieron 2.13 veces más riesgo ($IC_{95\%} = 1.521 - 3.008$, $p = 0.000$) de presentar este evento en comparación a los pacientes con dengue en el 2005-2008, siendo la exposición al período 2009 el principal factor para explicar el comportamiento de los casos con este trastorno circulatorio. El Denv-1 fue otro factor asociado al evento en cuestión (haz ratio=1.82, $IC_{95\%} = 1.163 - 2.867$, $p = 0.009$). La edad, el Denv-2, la respuesta inmune secundaria y el sexo no mostraron una asociación significativa ($p \geq 0.05$). (Tabla 7)

Tabla 7. Regresión de Cox frialdad distal en pacientes con dengue. Ajustado por ingreso temprano (3 primeros días de la enfermedad). Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

Factores de riesgo		Haz ratio	Intervalo de confianza 95%	Valor de p
Período 2009		2.13	1.521 – 3.008	0.000
Serotipo	Denv-1	1.82	1.163 – 2.867	0.009
	Denv-2	1.16	0.795 – 1.717	0.426
	Denv-3	1	Valor de referencia	---
Respuesta inmune secundaria		1.36	0.986 – 1.887	0.060
Igual o mayor de 8 años		1.17	0.871 – 1.588	0.287
Sexo	Femenino	1.02	0.775 – 1.341	0.887

Fuente: Base de estudio clínico de dengue.

Se determinó que la exposición al período 2009 fue el principal factor asociado que explica el comportamiento de **choque compensado** en los pacientes con dengue. Los pacientes con dengue del período 2009 tuvieron 2.81 ($IC_{95\%} = 1.856 - 4.273$; $p = 0.000$) veces más riesgo de presentar choque compensado en comparación a los pacientes del 2005-2008. Otros factores asociados a la mayor frecuencia de aparición y de manera más temprana de mal llenado capilar fueron; respuesta inmune secundaria (Haz. Ratio 1.68; $IC_{95\%} = 1.142 - 2.490$; $p = 0.009$) y Denv-1 (Haz. Ratio = 1.78; $IC_{95\%} = 1.040 - 3.068$; $p = 0.035$). La edad, el sexo y el Denv-2 no mostraron estar asociadas al evento en estudio ($p > 0.05$). (Tabla 8)

Tabla 8. Regresión de Cox para Choque compensado en pacientes con dengue. Ajustado por ingreso temprano (3 primeros días de la enfermedad). Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (HIMJR).

Factores de riesgo		Haz ratio	Intervalo de confianza 95%	Valor de p
Período 2009		2.81	1.856 – 4.273	0.000
Serotipo	Denv-1	1.78	1.040 – 3.068	0.035
	Denv-2	1.24	0.784 – 1.968	0.353
	Denv-3	1	Valor de referencia	---
Respuesta inmune secundaria		1.68	1.142 – 2.490	0.009
Igual o mayor de 8 años		1.04	0.733 – 1.491	0.803
Sexo	Femenino	0.93	0.879 – 1.771	0.705

Fuente: Base de estudio clínico de dengue.

DISCUSIÓN.

La epidemia de dengue del año 2009 en Nicaragua fue la de mayor importancia en la última década. Esta epidemia se caracterizó no sólo por la gran cantidad de pacientes que acudieron a las unidades de salud, sino también, porque se observó que los trastornos circulatorios tales como; mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado se presentaron mayormente en los primeros días de la enfermedad. Tradicionalmente se ha descrito que las manifestaciones de severidad o el período crítico del dengue inician comúnmente entre el 4to y 6to día de la enfermedad^{5, 30}, situación contraria a lo observado durante el año 2009.

Principales hallazgos del estudio. Este estudio muestra que durante el año 2009 la proporción de pacientes con dengue severo fue mayor (basado en la nueva clasificación de OMS) y que los trastornos circulatorios (mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado) se presentaron en mayor cantidad y de manera más temprana en los pacientes con dengue durante este período en comparación a los pacientes con dengue durante el período 2005-2008. Se demostró que el principal factor de riesgo de exposición a esta inusual presentación de trastornos circulatorios fue la exposición al dengue durante el período 2009.

Los análisis de frecuencia simple mostraron que al tercer día de la enfermedad ya se habían presentado el 50% o más de los eventos de mal llenado capilar, frialdad distal o choque compensado y a través de los análisis de sobrevida se evidenció que la probabilidad de aparición temprana de los trastornos circulatorios fue mayor durante el período 2009 que en período anterior (2005- 2008). Al estudiar los factores de riesgos que explicaban este comportamiento se encontró que la exposición al dengue durante el período 2009, la infección por el serotipo Denv-1 y la respuesta inmune secundaria fueron los factores asociados con el mal llenado capilar y la presencia de choque compensado. En el caso de la presentación de frialdad distal también se encontró que la exposición al período 2009 fue un factor de riesgo asociado, junto con la infección por el serotipo Denv-1. Para los tres trastornos circulatorios estudiados la exposición al año 2009 fue el factor de mayor riesgo.

El aumento de la permeabilidad capilar (fuga capilar) es el principal evento fisiopatológico que explica la severidad de los pacientes con dengue. Cuando existe una fuga capilar (fuga de líquido al espacio extravascular) se produce una respuesta fisiológica compensadora del

cuerpo, la cual consiste en una respuesta neuroendocrina para conservar la hemodinamia del paciente, caracterizada por aumento de la contractilidad cardíaca y del tono vascular periférico lo cual produce cambios de la microcirculación local (vasoconstricción), lo que conlleva a un aumento en el tiempo del llenado a nivel de capilares (mal llenado capilar) y a la presencia de frialdad distal. *Balmaseda et al* en el año 2006 un estudio realizado en Nicaragua encontró que serotipo Denv-1 es el más asociado a la presencia de fuga capilar en comparación con los demás serotipos ². Otros estudios han encontrado que el Denv-2 es el serotipo causante de la mayoría de los casos de fuga capilar^{8-9, 34}, pero ninguno de estos estudios ha descrito si el serotipo es un factor de riesgo asociado con la aparición más temprana de la fuga capilar o de trastornos circulatorios.

Una situación similar sucede con la respuesta inmune secundaria, en la que está bien documentada su importancia como factor de riesgo en las formas severas de la enfermedad ³⁵⁻³⁷. Al interactuar los anticuerpos heterólogos con el virus se produce una reacción cruzada que no neutraliza al sino que facilitan la infección de un mayor número de células con receptores Fc y por tanto incrementa la carga viral, e induce una repuesta inmune potente con liberación de mediadores químicos (Citoquinas) y activación del complemento cuyo resultado final es el aumento de la permeabilidad capilar. Sin embargo, estos eventos no explican la aparición temprana de trastornos circulatorios. En este estudio se demuestra que la respuesta inmune secundaria y el Denv-1 son factores de riesgos asociados a los trastornos circulatorios y a la aparición temprana de los mismos.

La exposición al virus del dengue durante el período 2009 fue el principal factor de riesgo asociado para los 3 trastornos circulatorios estudiados y por lo tanto se debe de determinar que eventos fueron diferentes durante este período en comparación con el período previo. Tres circunstancias especiales acontecieron durante el período 2009 que no sucedieron en el período 2005- 2008:

1. Circulación de serotipos: Desde el año 2005 al 2007 predominó el serotipo Denv-2 y a partir del año 2007 se comenzaron a reportar los primeros casos de dengue ocasionados por el serotipo Denv-3 siendo en el año 2008 el serotipo más frecuente y en el año 2009 el Denv-3 desplazó casi por completo a los demás serotipos (Figura 1). En este estudio se investigó si un cambio en el genoma (mutación) del Denv-3 2009 en comparación con los Denv-3 que

circularon en el 2008 explica el comportamiento atípico de los casos de dengue. Los análisis de la secuencia del Denv-3 2009 revelaron una alta homología con el Denv-3 2008, indicando que se trata de la misma cepa. Estos hallazgos coinciden con el análisis multivariado de regresión de Cox, el cual demostró que el serotipo Denv-3 no fue un factor de riesgo asociado a los trastornos circulatorios ($p > 0.05$).

2. Implementación de nuevas guías de clasificación, manejo, tratamiento y prevención de casos de Dengue de la OMS. En el año 2009, se implementaron las nuevas guías de dengue para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control de OMS en el hospital infantil Manuel de Jesús Rivera. Estas normas establecen que todo caso con dengue que presente un dato de alarma es indicación de líquidos intravenosos³⁰. Se ha demostrado que la terapia con líquidos intravenosos es eficiente para el tratamiento del choque en los pacientes con dengue con el fin de prevenir la evolución a un choque hipotensivo. Una administración temprana y oportuna de líquidos intravenosos en pacientes con datos de alarma podría explicar una reducción tanto en el número de casos de pacientes con choque compensado como los casos que evolucionan a un choque hipotensivo, así como la disminución de mortalidad debido al choque³⁸⁻⁴¹, pero esta terapia no explica la aparición más temprana de los trastornos circulatorios en los pacientes con dengue.

3. Pandemia de influenza A H1N1. Un evento particular durante el año 2009 fue la pandemia de influenza A H1N1. El primer caso reportado en Nicaragua fue en la ciudad de Managua y el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera fue uno de los principales centros de atención durante esta epidemia. Esta epidemia inició en el mes de Junio del año 2009, presentando un primer pico en ese mismo mes y un segundo pico más alto en el mes de agosto. Esta epidemia de influenza A H1N1 coincidió con la epidemia de dengue, la cual inició en el mes de agosto, presentando su pico más alto en el mes de octubre (Ver figura 8 en anexos). Este traslape de epidemias permitió la ocurrencia de co-infecciones de ambos virus. En un estudio realizado por *Pérez et al*, en el año 2009 en el HIMJR se documentaron la existencia de 4 casos de co-infecciones de dengue-influenza A H1N1, y manifestaciones severas, uno de ellos fue fatal. Dos de las cuatro co-infecciones fueron simultáneas y dos fueron consecutivas, es decir, primero hubo infección por influenza A H1N1 y posterior fue la infección por dengue⁷. *Rodríguez et al* en el año 2009 en un reporte de caso realizado en

Puerto Rico también demostró la presencia de una co-infección dengue-influenza A H1N1, durante un traslape de epidemias¹⁰.

Los estudios publicados sobre co-infecciones de influenza A H1N1 pandémica y dengue han sido serie de casos e igualmente se han documentados co-infecciones de dengue con influenza estacional, incluyendo el reporte de un caso fatal⁴². La poca cantidad de estos casos documentados no permiten establecer evidencia científica que demuestre que la co-infección de dengue con influenza sea o no un factor de riesgo para manifestaciones severas o presentaciones inusuales de los trastornos circulatorios⁴²⁻⁴³.

Las co-infecciones pueden ocurrir de manera natural y frecuente en las personas⁴⁴⁻⁴⁶ y se ha descrito que durante la respuesta del cuerpo ante una infección viral, una co-infección bacteriana secundaria puede causar diferentes situaciones, dependiendo de varios factores tales; el tipo de patógeno, el tiempo entre las infecciones y la ruta de infección⁴⁷⁻⁵¹. Un estudio por *Jamieson et al* en el año 2010 en modelos de ratón coinfectados por influenza e infección bacteriana (*listeria*) demostró que el daño producido al pulmón por la infección por el virus de la influenza desencadena una respuesta de estrés produciendo un incremento en los niveles séricos de glucocorticoides resultando en una respuesta de inmunosupresión sistémica. Se encontró que en los casos de co-infección de influenza y bacterias tuvieron mayor incremento de la carga bacteriana en comparación con los casos no co-infectados⁵². Esto podría ser la base para explicar la severidad asociada en los casos con co-infecciones de dengue e influenza A H1N1, e incluso tal vez explique por qué durante el período 2009 existieron más casos de trastornos circulatorios y de manera más temprana.

Consideraciones metodológicas, fortalezas y limitaciones del estudio. Este es el primer estudio hecho en Nicaragua que describe el comportamiento inusual de los trastornos circulatorios en los pacientes con dengue y lo describe en función de tiempo a través de un análisis de sobrevivencia. El diseño de cohorte de este estudio permitió medir la magnitud de los trastornos circulatorios en los pacientes y también permitió establecer el tiempo de aparición de los trastornos circulatorios, pero con limitante que en períodos de días y no en horas. Debido a que la aparición de los trastornos circulatorios son eventos muy agudos lo ideal sería establecer el tiempo de aparición en horas.

Otra limitante en esta investigación es que durante el período de las epidemias (dengue e influenza A H1N1) en el 2009 no se realizaban pruebas diagnósticas para investigar la presencia de ambas patologías, es decir, al paciente sospechoso de influenza sólo se le hacían pruebas diagnósticas para influenza y al paciente sospechoso de dengue, sólo se la hacía prueba para dengue. Esta situación no permitió conocer el número real de casos con co-infecciones y por lo tanto determinar si era o no un factor de riesgo asociado a los trastornos circulatorios. Esta situación limita generar y comprobar la hipótesis que las co-infecciones de Dengue e Influenza A H1N1 aumenta la severidad en los casos de dengue y conlleva a manifestaciones inusuales de los trastornos circulatorios.

CONCLUSIONES

Durante el período 2009 predominó la infección por el serotipo denv3 (88.8%) y la respuesta inmune primaria (52.2%).

Según la nueva clasificación de severidad de OMS el período 2009 (50.5%) presentó mayor severidad que el período 2005-2008 (40.7%).

Los trastornos circulatorios (mal llenado capilar, frialdad distal y choque compensado) se presentaron significativamente más temprano (2 días más temprano) y más frecuente durante el período 2009 en comparación al período 2005-2008.

Los factores de riesgo asociados al Mal Llenado Capilar fueron: exposición al dengue del año 2009 (HR 2.80, IC95% 1.856 – 4.238, p 0.000), infección por Denv-1 (HR 1.90, IC95% 1.106 – 3.288, p 0.020) y la respuesta inmune secundaria (HR 1.59, IC95% 1.088 – 2.342, p 0.017).

Los factores de riesgos asociados a Frialdad Distal fueron: exposición al dengue del año 2009 (HR 2.13, IC95% 1.521 – 3.008, p 0.000) y la infección por Denv-1 (HR 1.82, IC95% 1.163 – 2.867, p 0.009).

Los factores de riesgo asociados al Choque Compensado fueron: exposición al dengue del años 2009 (HR 2.81, IC95% 1.856 – 4.273, p 0.000), infección por Denv-1 (HR 1.78, IC95% 1.040 – 3.068, p 0.035) y la respuesta inmune secundaria (HR 1.68, IC95% 1.142 – 2.490, p 0.009).

Para los tres trastornos circulatorios la exposición al dengue del año 2009 fue el principal factor de riesgo asociado, independientemente del serotipo, respuesta inmune, edad, sexo y el ingreso temprano a la unidad de salud.

Existe la posibilidad que la co-infección de influenza A H1N1 pandémica y dengue sea la explicación a la presentación inusual de los trastornos circulatorios durante la epidemia de dengue del período 2009 pero se requieren estudios futuros que demuestren esta hipótesis.

RECOMENDACIONES.

A los investigadores:

Determinar la presencia de anticuerpos contra influenza A H1N1 pandémica en sueros pareados de pacientes del estudio clínico de dengue para determinar el número real de pacientes con co-infecciones y un posterior análisis que permita establecer si es un factor de riesgo para los trastornos circulatorios.

La realización de estudios en modelos de ratón para conocer la respuesta fisiopatológica de co-infecciones dengue e influenza A H1N1 pandémica.

A las universidades y centros asistenciales:

Capacitación a los profesionales de la salud y a estudiantes universitarios de las carreras médicas sobre la dinámica clínica del dengue, haciendo énfasis que las manifestaciones de severidad pueden ocurrir en cualquier momento de la enfermedad y no sólo a partir del 4to día como normalmente se describe.

Dar a conocer y capacitar sobre la nueva clasificación de severidad de OMS de casos de dengue desde la educación a nivel de pregrado (universidades), así como en hospitales y centros de salud.

REFERENCIAS.

1. Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J Pediatr* 1997;131:516-24.
2. Balmaseda A, Hammond SN, Perez L, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:449-56.
3. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997;176:313-21.
4. Nimmannitya S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987;18:392-7.
5. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 2004;80:588-601.
6. WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition 2009 ed: WHO; 2009.
7. Perez MA, Gordon A, Sanchez F, et al. Severe coinfections of dengue and pandemic influenza A H1N1 viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:1052-5.
8. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181:2-9.
9. Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:1063-70.
10. Lopez Rodriguez E, Tomashek KM, Gregory CJ, et al. Co-infection with dengue virus and pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 2010;16:882-4.
11. Feigin RD, Cherry JD. Dengue y fiebre hemorrágica del Dengue. In: *Tratado de Infecciones en Pediatría*. Segunda ed: Interamericana McGraw-Hill; 1992:1410-20.
12. Halstead SB. Dengue/fiebre hemorrágica dengue. In: *Interamericana M-H, ed. Tratado de Pediatría de Nelson*; 2001:1102-5.
13. DeMadrid AT, Porterfield JS. The Flaviviruses (group B arboviruses): A cross neutralization study. *Gen Virol* 1974:91-6.
14. Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *Immunol* 1967:291.
15. World Health Organization, Geneva (1997) Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition.

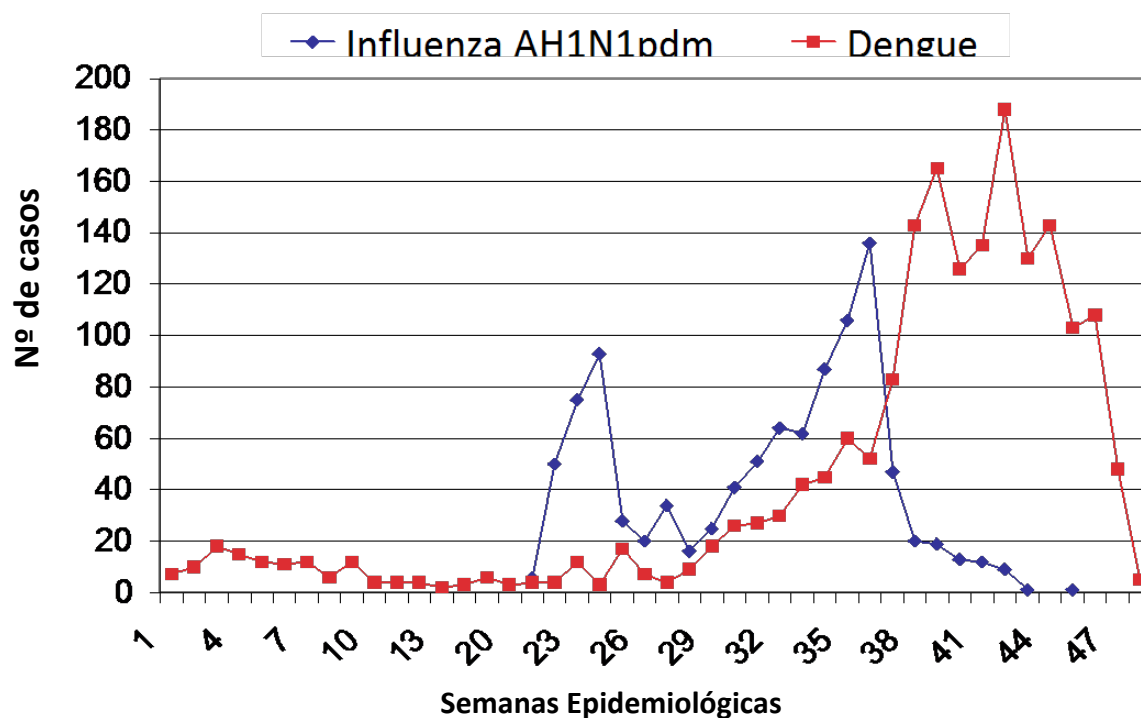
16. Actualización Regional Dengue: Programa Regional de Dengue (04 de febrero de 2010). Consultado el 07 de junio del 2010, de <http://new.paho.org/hq>.
17. Actualización: PROGRAMA REGIONAL DENGUE (actualizado al 17 de noviembre del 2009). Consultado el 7 junio del 2010, de <http://new.paho.org/hq>.
18. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev 1990;3:376-96.
19. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. Am J Trop Med Hyg 2003;69:5-11.
20. Halstead SB, Udomsakdi S, Simasthien P, Singharaj P, Sukhavachana P, Nisalak A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. Yale J Biol Med 1970;42:261-75.
21. Rice C, Knipe D, Howley. The virus and their replication. Fields Virology. Third ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
22. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. EMBO J 2004;23:728-38.
23. Chu JJ, Rajamanonmani R, Li J, Bhuvanakantham R, Lescar J, Ng ML. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. J Gen Virol 2005;86:405-12.
24. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell 2002;108:717-25.
25. Crill WD, Chang GJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. J Virol 2004;78:13975-86.
26. Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. Am J Trop Med Hyg 1989;41:576-80.
27. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. Am J Trop Med Hyg 1974;23:974-82.
28. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. Nature 1977;265:739-41.
29. World Health Organization, Geneva (2007) Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses.
30. Organización Mundial de la Salud, La Paz, Bolivia (2009). Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Nueva edición.

31. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:480-96.
32. Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:893-7.
33. Balmaseda A. Manual de Procedimientos de Técnicas para el Diagnóstico del Dengue. Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia. Ministerio de Salud, Managua. Nicaragua. ; 2002.
34. Kalayanaroj S, Nimmannitaya S. Clinical and Laboratory Presentations of Dengue Patients with Different Serotypes. *Dengue Bulletin* 2000;24:53-9.
35. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11:223-7.
36. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:154-6.
37. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120:653-69.
38. Ranjit S, Kissoon N, Jayakumar I. Aggressive management of dengue shock syndrome may decrease mortality rate: a suggested protocol. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:412-9.
39. Ngo NT, Cao XT, Kneen R, et al. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis* 2001;32:204-13.
40. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, et al. Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. *N Engl J Med* 2005;353:877-89.
41. Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, et al. Volume replacement in infants with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:684-91.
42. Leelarasamee A, Chupaprawan C, Chenchittikul M, Udompanthurat S. Etiologies of acute undifferentiated febrile illness in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2004;87:464-72.
43. Suttinont C, Losuwanaluk K, Niwatayakul K, et al. Causes of acute, undifferentiated, febrile illness in rural Thailand: results of a prospective observational study. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100:363-70.
44. Elston JW, Thaker HK. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:194-9.

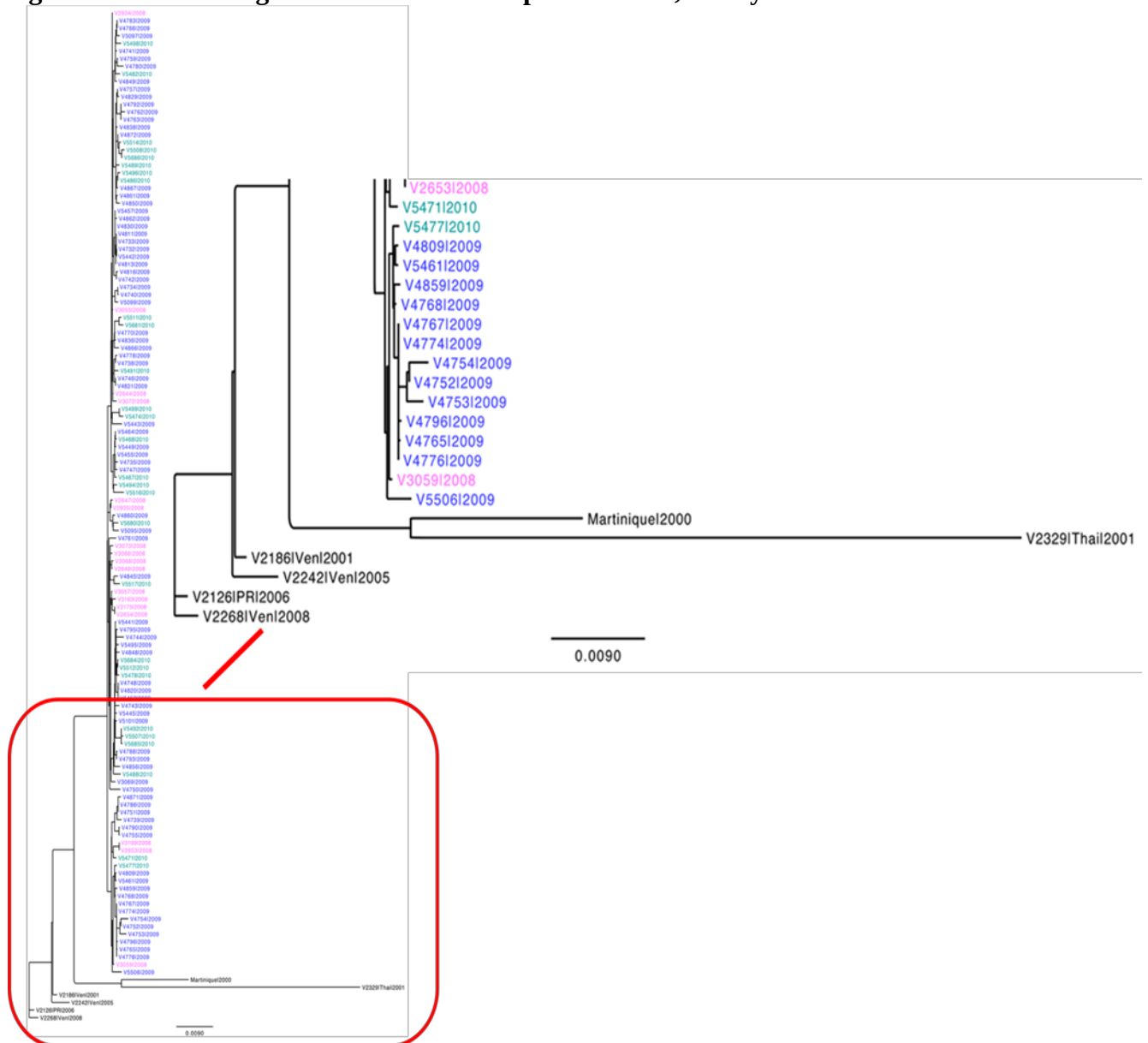
45. Beadling C, Slifka MK. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:185-91.
46. Renia L, Potter SM. Co-infection of malaria with HIV: an immunological perspective. *Parasite Immunol* 2006;28:589-95.
47. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 2007;447:326-9.
48. Gardner ID. Suppression of antibacterial immunity by infection with influenza virus. *J Infect Dis* 1981;144:225-31.
49. Gumenscheimer M, Balkow S, Simon MM, Jirillo E, Galanos C, Freudenberg MA. Stage of primary infection with lymphocytic choriomeningitis virus determines predisposition or resistance of mice to secondary bacterial infections. *Med Microbiol Immunol* 2007;196:79-88.
50. Humphreys TD, Khanolkar A, Badovinac VP, Harty JT. Generation and maintenance of *Listeria*-specific CD8⁺ T cell responses in perforin-deficient mice chronically infected with LCMV. *Virology* 2008;370:310-22.
51. Navarini AA, Recher M, Lang KS, et al. Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15535-9.
52. Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2010;7:103-14.

ANEXOS

Figura 8. Casos de dengue e Influenza A H1N1 durante año 2009.



Fuente: Vigilancia Nacional – Ministerio de Salud de Nicaragua

Figura 9. Analisis filogenético del Denv3 del período 2008, 2009 y 2010.

Se muestran la secuencia de virus del dengue serotipo 3. Se analizaron 17 virus el 2008 (en color rosado), 82 virus el año 2009 (color azul) y 28 virus del 2010 (color verde). El análisis muestra que el virus del dengue serotipo 3 de la temporada 2009 es idéntico en más del 99% con el virus del dengue del año 2008 y 2010.

El análisis de secuencia se realizó en el instituto Broad de Boston usando combinación de la secuencia de Sanger y pyrosecuenciación de alta definición (454/Roche). Las secuencias fueron alineadas usando Muscle, con parámetros optimizados para máxima precisión. Las secuencias alineadas fueron estratificadas usando phyML con los siguientes parámetros: (a) modelo de sustitución = HKY85, (b) número de sustitución de categorías=cuatro, (c) proporción de sitios invariantes = - cero, y (d) valores estimados para frecuencias de equilibrio, transición/transversión de radio parámetros de formas gamma.



REPUBLICA DE NICARAGUA
MINISTERIO DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA
COMITÉ INSTITUCIONAL DE REVISIÓN ÉTICA
IRB 00005231 y FWA 00009658



ACTA DE NOTIFICACIÓN DE DECISION DEL CIRE

Estimada investigadora:

Prof. Eva Harris, division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley, USA.

El Comité Institucional de Revisión Ética (CIRE), del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua, se reunió el día 20/08/2009, con el objetivos de revisar cambios realizados al protocolo y anexos recibidos con 28/07/2009, de la investigación que lleva por nombre **Estudio hospitalario prospectivo de la clasificación y manejo de Caso de Dengue en Nicaragua**, registrada con el código # NIC-MINSA/CNDR CIRE-01/10/06-13.4. En el futuro, usted debe plasmar este código a cualquier correspondencia relacionada con este estudio y el CIRE.

EL CIRE HA DECIDIDO APROBAR EL PROTOCOLO DE INVESTIGACION EN SU FORMA ACTUAL INCLUYENDO TODOS LOS CAMBIOS PRESENTADOS A LA FECHA, SIN OBSERVACION ALGUNA.

La fecha de expiración de éste aprobación es hasta el **31 de Agosto del 2010**. Si, su estudio o proyecto de investigación se prolongará más de esta fecha usted (es) deben solicitar una nueva aprobación, (aproximadamente 6 semanas antes de la fecha de su vencimiento). Usted (es) deben solicitar al CIRE el formulario de renovación de estudios y/o protocolos de investigación, para acceder a una nueva aprobación, se pide cumpla con el llenado y entrega en las fechas estipuladas.

Es importante mencionar, que aunque el CIRE ha aprobado su proyecto de investigación en su forma actual, si usted (es) realizan cambios tanto estructurales como en el diseño de investigación en el que de alguna forma se afecte a los sujetos humanos incluidos en estudio, usted tiene la obligación de notificar inmediatamente al CIRE, en caso contrario usted (es) estarían cayendo en desacato y sujeto a sanciones administrativas o penales, según lo amerite el caso. O bien, si uno de sus sujetos incluidos en estudio presenta un evento adverso durante el transcurso de la investigación, usted también debe notificar lo más tardar en los primeros 10 días subsiguiente al evento.

Durante el transcurso del estudio y/o proyecto de investigación El CIRE puede realizar sin previo aviso revisión del cumplimiento de las actividades contempladas en su protocolo de investigación.

Cordialmente,


Dr. Alberto Montoya Pérez
Coordinador del CIRE
CNDR- MINSA



Cc: Archivo.

COMPLEJO NACIONAL DE SALUD, DRA. CONCEPCION PALACIOS
TEL: # 289-4604; FAX # (505) 289-7723; E-mail: parasitologia@minsa.gob.ni


Re 20/08/09