UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

"DIAGNÓSTICO DE DENGUE UTILIZANDO IgM ANTI-DENGUE Y SEROTIPIFICACIÓN VIRAL"

Diagnóstico por medio de IgM anti-dengue por método de ELISA e identificación de serotipos virales por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en pacientes con sospecha clínica de dengue captados en el Centro de Salud de Gualán, aldeas y barrios del municipio de Gualán y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 (mayo-julio 2010)

Jorge Rolando Fajardo Moreno
Didier Geovanny Cuc Güitz
Aura Elizabeth López Guillermo
Yuri Melina Velásquez Fong
Lorena Maricel Alay Chinchilla

Médico y Cirujano

Guatemala, septiembre de 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

"DIAGNÓSTICO DE DENGUE UTILIZANDO IgM ANTI-DENGUE Y SEROTIPIFICACIÓN VIRAL"

Diagnóstico por medio de IgM anti-dengue por método de ELISA e identificación de serotipos virales por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en pacientes con sospecha clínica de dengue captados en el Centro de Salud de Gualán, aldeas y barrios del municipio de Gualán y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 (mayo-julio 2010)

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Jorge Rolando Fajardo Moreno
Didier Geovanny Cuc Güitz
Aura Elizabeth López Guillermo
Yuri Melina Velásquez Fong
Lorena Maricel Alay Chinchilla

Médico y Cirujano

Guatemala, septiembre de 2010

El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que:

Los estudiantes:

Jorge Rolando Fajardo Moreno	9617626
Didier Geovanny Cuc Güitz	9710049
Aura Elizabeth López Guillermo	199810597
Yuri Melina Velásquez Fong	199919130
Lorena Maricel Alay Chinchilla	200017816

Han cumplido con los requisitos solicitados por esta facultad, previo a optar al título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

Diagnóstico de dengue utilizando IgM anti-dengue y serotipificación viral

Diagnóstico por medio de IgM anti-dengue por método de ELISA e identificación de serotipos virales por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en pacientes con sospecha clínica de dengue captados en el Centro de Salud de Gualán, aldeas y barrios del municipio de Gualán y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 (mayo –julio 2010)

Trabajo asesorado por la Dra. Carmen Irene Villagrán de Tercero y revisado por el Dr. Edwin Fernando Mérida Martínez, quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior se emite, firma y sella la presente:

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la ciudad de Guatemala, a los 16 días del mes de septiembre del dos mil diez

DR. JESÚS ARNULFO OLIVA LEAL

DECANO

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Dr. Jesús Arnulfo Oliva Leal
DECANO
2006-2010

El infrascrito Coordinador de la Unidad de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que:

Los estudiantes:

Jorge Rolando Fajardo Moreno	9617626
Didier Geovanny Cuc Güitz	9710049
Aura Elizabeth López Guillermo	199810597
Yuri Melina Velásquez Fong	199919130
Lorena Maricel Alay Chinchilla	200017816

Han cumplido con los requisitos solicitados por esta facultad, previo a optar al título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

Diagnóstico de dengue utilizando IgM anti-dengue y serotipificación viral

Diagnóstico por medio de IgM anti-dengue por método de ELISA e identificación de serotipos virales por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en pacientes con sospecha clínica de dengue captados en el Centro de Salud de Gualán, aldeas y barrios del municipio de Gualán y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 (mayo –julio 2010)

El cual ha sido revisado y corregido, ya al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Unidad, se les autoriza a continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala, el 16 de septiembre del dos mil diez.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Dr. Edgar Rodolfo de León Barillas

Coordinador

Unidad de Trabajos de Graduación

Guatemala 16 de septiembre del 2010

Doctor
Edgar Rodolfo de León Barillas
Unidad de Trabajos de Graduación
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Dr. de León:

Le informo que los estudiantes abajo firmantes,

Jorge Rolando Fajardo Moreno _____

Didier Geovanny Cuc Güitz _____

Aura Elizabeth López Guillermo _____

Yuri Melina Velásquez Fong _____

Lorena Maricel Alay Chinchilla _____

Presentaron el informe final del Trabajo de Graduación titulado:

Diagnóstico de dengue utilizando IgM anti-dengue y serotipificación viral.

Diagnóstico por medio de IgM anti-dengue por método de ELISA e identificación de serotipos virales por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en pacientes con sospecha clínica de dengue captados en el Centro de Salud de Gualán, aldeas y barrios del municipio de Gualán y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 (mayo –julio 2010)

Del cual como asesora y revisor nos responsabilizamos por la metodología, confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

Asesora _____ Revisor _____

Firma y sello Dra. Carmen Villagrán de Tercero MEDICO PEDIATRA COLEGIADA NO 3177

Firma y sello Edwin Fernando Mérida Gil MEDICO Y CIRUJANO Colegiado No. 3566

No. Reg de personal 12574

RESUMEN

OBJETIVO: **"Diagnóstico de dengue utilizando IgM anti dengue, serotipificación viral por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real e identificación de proteína NS1 en pacientes con sospecha clínica de dengue durante las semanas epidemiológicas 21 a 27. METODOLOGÍA:** Se identificaron casos en el Centro de Salud de Gualán, por búsqueda activa en comunidad abierta en aldeas y barrios del municipio y en el Hospital Regional de Zacapa en pacientes ingresados con impresión clínica de dengue, posteriormente se seleccionaron aquellos que llenaban los criterios de caso sospechoso según la OPS. Se elaboró un instrumento de recolección, incluyendo datos clínicos y epidemiológicos de los participantes. Se utilizó para el diagnóstico ELISA IgM anti-dengue, serotipificación viral por PCR en tiempo real e identificación de proteína NS1. Los datos obtenidos fueron ingresados en una base de datos y procesados en Epi-Info. **RESULTADOS:** Se identificaron 131 "casos sospechosos", 71 comunitarios y 60 hospitalarios, confirmándose 38 por medio de IgM anti dengue o PCR, identificándose los serotipos 1 y 2; el intervalo de edad más afectado fue de 10 a 19 años en la comunidad y de 0 a 9 años en el Hospital, se detectó la presencia de proteína NS1 en 4 pacientes con dengue leve y moderado. **CONCLUSIONES:** durante las semanas 21 a 27, se identificaron 131 casos sospechosos 71 en la comunidad y 60 en el Hospital Regional de Zacapa, confirmándose 38; se determinó que el intervalo de edad más afectado es de 10 a 19 años; el serotipo DEN-2 está asociado a manifestaciones clínicas severas; los serotipos virales encontrados fueron DEN-1 y DEN-2; se determinó presencia de proteína NS1 en pacientes con dengue leve y moderado.

PALABRAS CLAVE: *Dengue, Proteína NS1, Serotipificación viral*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
2. OBJETIVOS 3

3. MARCO TEÓRICO 5
3.1 Definición 5
3.2 Antecedentes 6
3.3 Epidemiología 8
3.4 Vector 11
3.5 Programas de prevención y control del *Aedes Aegipty* y el Dengue 14
3.6 Características del Virus 20
3.7 Serotipos del virus del Dengue 21
3.8 Hospedero del virus del Dengue 26
3.9 Manifestaciones Clínicas 29
3.10 Clasificación 29
3.11 Diagnóstico 30
3.12 Diagnóstico Serológico 34
3.13 Diagnóstico Confirmatorio 36
3.14 Otras Técnicas 37
3.15 Fiebre Hemorrágica del Dengue 40
3.16 Tratamiento 43
4. METODOLOGÍA 45
4.1 Tipo y diseño de investigación 45
4.2 Unidad Primaria de muestras 45
4.3 Unidad de análisis 45
4.4 Criterios de exclusión 46
4.5 Definición y Operacionalización de variables 46
4.6 Instrumento, procedimientos y técnicas 47
4.7 Procesamiento y análisis de datos 51
4.8 Alcances y límites de la investigación 52
4.9 Aspectos éticos 52
5. RESULTADOS 53
5.1 Tabla 1. Distribución epidemiológica de casos sospechosos y diagnosticados 53
5.2 Tabla 2. Cuadro comparativo de datos epidemiológicos y clínicos 54
5.3 Gráfica 1. Frecuencia de casos sospechosos y confirmados por semanas epidemiológicas 55
5.4 Tabla 3. Síntomas y signos más frecuentes 55
5.5 Diagrama 1. Origen, clasificación, severidad , método diagnóstico, serotipo y proteína NS1 56
5.6 Tabla 4. Clasificación del dengue en pacientes con diagnóstico Confirmado 57
6. DISCUSIÓN 59
7. CONCLUSIONES 63
8. RECOMENDACIONES 65
9. APORTES 67
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69
11. ANEXOS 73

1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril causada por un virus de ARN del género Flavivirus, transmitida por vectores, *Aedes aegypti* es el principal transmisor (1). La enfermedad se encuentra distribuida en gran parte de los países tropicales y subtropicales, es endémica en muchos de ellos, produciendo epidemias de forma estacional, diagnosticándose alrededor de 100,000,000 nuevos casos en todo el mundo (1). El primer brote de dengue clásico reportado en Guatemala se localizó en el departamento de Escuintla en 1981. El primer brote grave en el país ocurrió en 1987, el serotipo aislado en ese año fue DEN-1; en 1991 los casos de dengue llegaron a 10,968. Durante el año 2000 se reportaron 18 casos de Fiebre Hemorrágica del dengue incluyendo seis defunciones (2). En Guatemala el número total de casos confirmados durante el año 2009 fue de 12,142 elevando la incidencia en un 238.8% con respecto al año 2008 (2). En el municipio de Gualán Zacapa, durante la epidemia del año 2009 se notificaron 438 casos sospechosos de dengue, confirmándose solamente 22. En el Hospital Regional de Zacapa en ese mismo año, se reportaron 1082 casos de dengue (3,4). La enfermedad producida por el virus del dengue se caracteriza por fiebre con duración aproximada de 7 días acompañada de cefalea, dolor retroorbitario, mialgias, artralgias, erupción cutánea y en algunos casos por manifestaciones hemorrágicas (1). Ésta enfermedad se ve influida por múltiples factores; el vector transmisor del virus del dengue, se reproduce en hábitats generados por la actividad humana, principalmente en agua semi-limpia (1). En Guatemala durante los últimos 5 años, la enfermedad producida por el virus del dengue ha aumentado a partir de la semana epidemiológica 17, alcanzando el pico más alto de casos alrededor de la semana epidemiológica 33 (4). Los serotipos del virus identificados en Guatemala hasta ahora son DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (4).

A través del presente estudio se hizo diagnóstico serológico de dengue utilizando ensayo inmunoenzimático (ELISA) y del serotipo viral implicado en la infección por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR-RT). El tipo y diseño de investigación utilizado para este estudio fue descriptivo. Los principales resultados fueron los siguientes: se incluyeron 131 casos sospechosos de dengue, confirmándose 38 de ellos (29% del total de los casos), 18 provenían del Centro de Salud de Gualán, de búsqueda activa en comunidad abierta y 20 provenían del hospital. Los serotipos DEN-1 y DEN-2, predominando éste último, se relacionaron con las manifestaciones clínicas más comunes (fiebre, dolor retroorbitario, cefalea, artralgias y mialgias), con similar frecuencia.

El intervalo de edad más frecuente fue entre 10 a 19 años. En total se analizaron 109 muestras para IgM anti dengue de las cuales 30 fueron positivas; con PCR se procesaron 59 muestras provenientes del hospital, de las cuales solamente una fue positiva y 13 muestras provenientes de la comunidad, de las cuales 12 fueron positivas. Se encontró que la mayor parte de los casos comunitarios sospechosos de dengue clasificados por síntomas, 29 correspondieron a severidad moderada, 2 de severidad leve y únicamente se encontró un caso complicado, de los casos hospitalizados, igualmente, 52 fueron de severidad moderada, encontrándose en 39 casos leves y 6 casos severos. Del total de casos confirmados, se procesaron 15 muestras para determinación de proteína NS1, seleccionadas al azar por criterios del Laboratorio Nacional de Salud, de las cuales 4 fueron positivas, relacionándose a casos leves y moderados de dengue.

El presente estudio aportó datos útiles ya que la enfermedad tiene un comportamiento cíclico estacional; el conocimiento de los serotipos circulantes actualmente proporcionó información para la vigilancia epidemiológica local.

Se agradece a la Licenciada Yolanda Mencos, Licenciado Sergio Meneses del área de Virología del UCREVE del Laboratorio Nacional de Salud, al personal médico, administrativo y técnico del Hospital Regional de Zacapa y al personal del Centro de Salud de Gualán Zacapa, las facilidades y atenciones brindadas para la realización del presente estudio.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Diagnosticar casos de dengue por medio de IgM anti-dengue, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, serotipificación viral e identificación de proteína NS1 en pacientes con sospecha clínica de dengue.

2.2 Específicos:

2.2.1 Identificar casos sospechosos de dengue en los pacientes que consulten a los servicios de Salud del municipio de Gualán durante las semanas epidemiológicas 21 a 27.

2.2.2 Confirmar casos sospechosos de dengue mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real e IgM anti-dengue.

2.2.3 Determinar la edad más afectada por dengue.

2.2.4 Relacionar manifestaciones clínicas con serotipo viral circulante.

2.2.5 Identificar serotipo viral circulante en ambiente comunitario y ambiente hospitalario.

2.2.6 Determinar la presencia de proteína NS1 en pacientes con diagnóstico de dengue severo.

3. MARCO TEÓRICO

DENGUE

3.1 Definición

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por un virus de ácido ribonucleico (ARN) del género Flavivirus, transmitida por vectores, siendo *Aedes aegypti* el principal transmisor. La enfermedad puede ser causada por cualquiera de los cuatro serotipos del género, que se caracteriza por fiebre de inicio súbito con duración de 2 a 7 días acompañada de artralgias, mialgias y dolor retroorbitario (5).

Se describen varias formas de presentación: el clásico, la Fiebre Hemorrágica de dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD), asintomático y formas atípicas. Se describen cuatro serotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) (6,7).

3.2 Antecedentes

Antiguamente el dengue fue conocido como fiebre quebrantahuesos debido a los síntomas clínicos tales como artralgias y mialgias (8). Escritos encontrados en Puerto Rico en 1771, describen una fiebre con dolores osteomusculares utilizando el término quebrantahuesos. En 1801, la Reina de España utiliza el término dengue para describir esta enfermedad. El Dr. James Christie, en 1827 propuso que la palabra dengue se originó de la frase *Ka dinga Pepo*, de la lengua africana Swahili, que significa una especie de plaga o mal producida por un espíritu diabólico. En Cuba, esta frase fue llevada popularmente al español con la palabra dengue, en las Antillas también se le conoció como Denguero, fiebre Bouquet, fiebre Polka, fiebre de cinco días y en las Indias del Oeste británico con la palabra Dandy (7). En las Américas se han registrado acontecimientos importantes respecto al dengue, como la primera epidemia de dengue hemorrágico documentado en Cuba en el año 1981(9). Durante los 10 años siguientes, se observaron casos esporádicos de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica de dengue; después en 1990 Venezuela presentó la segunda epidemia grave en la región; estos casos marcaron claramente al dengue y FHD como una enfermedad emergente en las Américas.

En Costa Rica y Panamá, no se reportaron casos de dengue por varios decenios sin embargo en el año de 1995 surge una epidemia, aislándose el serotipo 1. El año siguiente la epidemia se propaga a otros países centroamericanos y a México.

En Guatemala se han realizado estudios acerca del serotipo circulante en las regiones endémicas de nuestro país, encontrándose los serotipos DEN-1,2 3 y 4, lo que evidencia que la población estudiada se encuentra en riesgo de adquirir dengue hemorrágico, aumentándose el riesgo si la primoinfección es con el serotipo DEN-2 (4).

Se encontraron estudios previos, los cuales relacionaron el serotipo de virus, con el patrón de infección y dengue hemorrágico, los cuales evidenciaron la prevalencia del serotipo DEN-1 y el DEN-2, asociándose más a infecciones secundarias que el DEN-3, y encontrándose que el dengue hemorrágico se asocia más con la infección por DEN-2 (10).
Dichas revisiones, reflejan la importancia del diagnóstico de dicha enfermedad e identificación de serotipo, ya que el mismo se relaciona con la presentación severa del dengue, como lo es la Fiebre Hemorrágica del dengue.

3.3 Epidemiología

De las enfermedades tropicales causadas por arbovirus, el dengue es la más extendida a nivel mundial. Ésta enfermedad se conoce desde hace 200 años en América, pero en los últimos 40 años se han notificado varias pandemias e innumerables epidemias, lo cual ha repercutido en el ámbito económico y social, convirtiéndose en un problema grave para las poblaciones tanto de países desarrollados como subdesarrollados (10).

La organización Mundial de la Salud, estima que este virus constituye una amenaza para el 40% de la población mundial. En 1998, la OMS consideró al dengue como la décima causa de muerte por enfermedades infecciosas, siendo los menores de 15 años las principales víctimas de este padecimiento (9).

El *Aedes aegypti* se ha encontrado en sitios más altos y fríos que los previamente reconocidos. En el pasado, las áreas infestadas correspondían a una máxima altura

de 1200 metros sobre el nivel del mar (snm); recientemente, el mosquito se ha encontrado en Colombia a una altura de hasta 2400 metros snm, en un sitio donde la temperatura promedio era de 17°C. La susceptibilidad del mosquito a infectarse oralmente con los virus del dengue está asociada a la barrera intestinal. Su capacidad intrínseca de adaptación y su competencia como vector tiene una base genética. Las variaciones en su competencia tienen importancia epidemiológica y pueden explicar algunas diferencias en los patrones de distribución geográfica (10). Suele encontrarse *Aedes aegypti* entré las latitudes 35º norte y 35º sur (11).

En Guatemala se ha notificado la existencia del vector *Aedes aegypti* desde 1860, pero el dengue no es reconocido hasta el año de 1978; El primer brote de dengue clásico se localizo en el departamento de Escuintla; Posteriormente se revisó el archivo de la División de Malaria buscando información sobre el diagnostico de dengue a través de laboratorio, por aislamiento e identificación del virus sin encontrar ninguna evidencia de dicho diagnostico (6). El vector se ha encontrado en 19 de 22 departamentos de la república de Guatemala (7).

El primer brote grave en el país ocurrió en 1987, el serotipo aislado en este brote fue DEN-1; en 1991 los casos de dengue llegaron a número máximo de 10,968. Durante el año 2000 se reportaron 18 casos de FHD incluyendo seis defunciones, registradas en los departamentos de Zacapa, Santa Rosa, Escuintla y El Progreso. Durante este brote el serotipo DEN-2 ha sido el único aislado (9).

En el año 2009, el Ministerio de Salud de Guatemala reportó un acumulado de 12,142 casos elevando la incidencia en un 238.8% con respecto al año 2008, 238 casos de dengue hemorrágico y 28 fallecidos. El 60% de casos y 85% de fallecidos fueron reportados en los departamentos de Izabal, Peten, Zacapa y Chiquimula. Los serotipos circulantes fueron DEN- 2 Y 4 (2).
La OPS define caso sospechoso de dengue como: paciente con enfermedad febril aguda de 2 a 7 días de duración máxima y con dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: cefalea, dolor retroorbitario, mialgias, artralgias, erupción cutánea y leucopenia con manifestaciones hemorrágicas (9).

Caso confirmado de dengue se define como caso sospechoso con prueba serológica confirmatoria positiva: IgM+ (9).

3.4 Vector:

3.4.1 Vector *Aedes aegypti*

Es de color negro con dibujos plateados en el tórax y patas. En el mesonoto (porción dorsal), hay dos líneas longitudinales centrales y paralelas y dos externas, laterales, que hacia adelante se encurvan hacia dentro y atrás, con una ligera concavidad hacia afuera; las cuatro líneas están formadas por escamas plateadas y dan el aspecto de lira característico de la especie. Las patas posteriores presentan anillos blancos. La larva y pupa tienen sifón respiratorio corto. Los huevos pequeños y negros, son puestos y aislados por encima del nivel del agua, pues deben pasar cierto tiempo en seco y a la espera de la llegada del agua. Los huevos permanecen viables varios meses en seco; este fenómeno biológico, se conoce como resistencia ovular, de importancia particular en la preservación de las especies. Los criaderos preferidos, se encuentran en recipientes que tiene agua limpia para beber, como barriles, toneles, tinajas, entre otros. También se les encuentra en latas vacías, botellas, floreros o en cementerios, frascos de vidrio o llantas en los que, se deposita agua de lluvia y son criaderos de larvas. Las hembras pican al atardecer o en la noche, el ataque es silencioso y buscan los pies, tobillos o cuello; la picadura no es dolorosa en el momento. Sobrevive un promedio de 15 a 30 días, alimentándose aproximadamente cada tres días (10).

Se reconocen tres huéspedes naturales: los primates, el mosquito del género *Aedes* y el hombre. La susceptibilidad parece ser universal, siendo el sexo femenino el más propenso a la infección; se ha demostrado que la raza blanca y los asiáticos, son más susceptibles a la picadura (12,13).

3.4.2 Alimentación

Las hembras se alimentan de la mayoría de vertebrados, pero prefieren a los humanos, vuelan en sentido contrario al viento y son atraídas por los olores y gases del hombre. La sangre sirve para el desarrollo de los huevos.

3.4.3 Ciclo Gonadotrófico

Después de cada alimentación se desarrolla un lote de huevos. Si la hembra completa su alimentación sanguínea (2-3 ml) desarrollará y pondrá 100-200 huevos, el intervalo dura de dos a tres días. La hembra grávida buscará recipientes oscuros o sombreados para depositar sus huevos, prefiriendo aguas limpias y claras.

3.4.4 Rango de vuelo

La hembra no sobrepasa los 50-100 m durante su vida (puede permanecer en la misma casa donde emergió). Si no hay recipientes, una hembra grávida puede volar tres kilómetros para poner sus huevos.

3.4.5 Ciclo evolutivo del *Aedes aegypti*

Los huevos, menores de un milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de 2 a 3 días. Con posterioridad a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobrevidas de siete meses a un año.

Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estados larvarios, creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de 1 mm. A los 6 o 7 mm. finales (12).

Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29° C, en 5 a 7 días, estando dotadas de movimientos característicos verticales, entre fondo y superficie, disponiéndose en forma de ese (S) durante los mismos. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10° C, superiores a 44° o 46° C, impidiéndose a menos de 13° C su pasaje a estadio pupal. La pupa no requiere alimentación y entre 28° y 32° C, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período.

El ciclo completo de *A. aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en 10 días (14).

3.4.6 Características morfológicas:

3.4.6.1 Huevo

Son muy pequeños y difíciles de ver a simple vista en los depósitos. Cuando hay una gran cantidad de ellos forman una línea irregular, obscura, por encima de la superficie del agua.

3.4.6.2 Larva

Tiene la cabeza pequeña y redondeada, algo más ancha que larga, con antenas poco visibles; su tórax es de tamaño relativamente reducido. La larva, cuando no está en el fondo del depósito alimentándose, se encuentra respirando en la superficie del agua en una posición aproximadamente perpendicular a la superficie del agua; tiene fotofobia, se asusta con facilidad y huye, permaneciendo sumergida en el fondo del depósito.

3.4.6.3 Pupa

La larva completa su desarrollo, se transforma en pupa y pasa la mayor parte del tiempo en relativa tranquilidad, respirando en la superficie del agua.

3.4.6.4 Adulto

Es un mosquito de coloración obscura generalmente negro, que se caracteriza principalmente por su dibujo en forma de lira blanca sobre el tórax, manchas plateadas en las partes laterales del tórax y el abdomen, patas con anillos blancos (15).

3.5 Programas de prevención y control del *Aedes Aegipty* y el Dengue

3.5.1 Programa Regional de Dengue, OPS

La misión del programa regional de control del dengue tiene como objetivos:

- Reducir la morbimortalidad y carga social-económica causada por los brotes y epidemias de dengue, en base a las resoluciones del consejo directivo de la OPS en 2001 CD43.R4 y la Resolución CD 44.R9 en el 2003.
- Enfocar las políticas de salud pública hacia una integración multisectorial e interdisciplinaria que permita desarrollar, implementar y consolidar una Estrategia de Gestión Integral (EGI) para la prevención y control del dengue.
- Estrategia de Gestión Integrada (EGI) para dengue. Como parte del esfuerzo que la OPS realiza para hacer frente a este desafío y en base a un nuevo modelo de trabajo integrado que incluye la promoción de la salud y la búsqueda de nuevas asociaciones, se elabora la *Estrategia de Gestión Integrada* (EGI) para prevenir y controlar el dengue, con la cual se espera crear asociaciones más fuertes para reducir los factores de riesgo de transmisión del dengue, instrumentar un sistema de vigilancia integral y reducir las poblaciones de *Aedes aegypti* a niveles de control, además se espera dar una mejor preparación a los laboratorios para detectar e identificar el virus, fortalecer el manejo de brotes y epidemias e incluir a la comunidad como fuerte participante en la prevención del dengue y las acciones de su control. En consecuencia, se espera que estos cambios esperados reduzcan las tasas de incidencia y letalidad del dengue (16).

Para ello, se desarrollan actividades tales como:

- Asesoramiento técnico a los países para la implementación y ejecución del decálogo de la estrategia integrada, resultante de la Resolución CD43.R4 y poner en práctica la Resolución CD44.R9.
- Creación del Grupo de Trabajo de Dengue (GT-Dengue), una nueva forma de cooperación técnica formado por un grupo de expertos que ayudarán a los países a fortalecer los programas nacionales y llevarlos hacia una estrategia nacional de gestión integrada.
- Evaluaciones periódicas de los programas nacionales de prevención y control del dengue (interna y externa), con la participación del GT-Dengue (Grupo Técnico Dengue).

- Reuniones, cursos y talleres para la capacitación de personal técnico/gerencial para la implementación y ejecución de la estrategia integrada, resultante de la Resolución CD43.R4 y la CD44.R9.
- Producción, selección y diseminación de materiales de comunicación social e información técnica y científica para fortalecer la estrategia integrada, resultante de la Resolución CD43.R4.

3.5.2 Comunicación para impactar la conducta en dengue (COMBI)

La nueva generación de programas de prevención y control del dengue se ubica bajo el fortalecimiento de la prevención y control del dengue a través de la participación comunitaria y la educación en salud. A pesar de los múltiples esfuerzos que los países se encuentran haciendo, no se ha logrado el impacto deseado en el control de la enfermedad. Ante esta situación la OPS/OMS y como parte de la Estrategia de Gestión Integrada, se incorpora la *metodología COMBI (Comunicación para impactar en conducta) orientada a dengue.* COMBI es un proceso que armoniza de manera equilibrada una variedad de intervenciones de comunicación para motivar, estimular y animar a la población a tomar consideración, eventual adopción y mantenimiento de acciones de prevención y control del dengue. COMBI incorpora más de 50 años de experiencia en educación para la salud, comunicación y teorías de cambios conductuales en una estrategia enfocada a la conducta específica de individuos y familias. COMBI también incorpora las experiencias del sector privado, como la comunicación con el consumidor (16).

La metodología integra eficazmente educación para la salud, información-educación-comunicación (IEC), movilización social, técnicas en comunicación con el consumidor (mercadeo) y la investigación formativa o análisis situacional. Todo esto dirigido puntualmente a un objetivo conductual preciso y específico para la salud, un enfoque muy adecuado para la prevención, control y eliminación de enfermedades transmisibles, que en este caso, está siendo aplicada para el dengue. La metodología COMBI realizará las siguientes actividades:

- Talleres *COMBI* de capacitación a equipos multidisciplinarios.

- Capacitación para la elaboración de los planes COMBI.
- Asesoría Técnica para la implementación de los planes elaborados, monitoreo y evaluación de los mismos.
- Preparación, publicación y distribución de la *Guía COMBI*.

En el 2003, se llevó a cabo en Nicaragua el primer taller de capacitación, con equipos multidisciplinarios de cuatro países (Costa Rica, Guatemala, Nicaragua y República Dominicana). Se efectuaron capacitaciones en la metodología COMBI a otros países en la región, en talleres realizados en Honduras (con participantes de Belice, El Salvador, Honduras y Panamá), Colombia (con equipos de Bolivia, Colombia, Ecuador y Venezuela), Brasil (con la participación de cuatro municipios en los estados de Ceará, Maranhão, Minas Gerais y Rió Grande do Sul) y Trinidad (con la participación de Bahamas, Barbados, Santa Lucía y Trinidad y Tobago).

Los resultados de estos talleres son: 20 Planes COMBI elaborados, un plan en el proceso de implementación (Nicaragua), un plan en la fase de investigación formativa (Guatemala), un plan en la fase de reajuste antes de empezar la investigación (Costa Rica), y cuatro planes en el proceso de reajuste y aprobación por las autoridades de Brasil. Un plan de la región andina y uno del Caribe inglés está en la fase de aprobación (16).

3.5.3 Red mundial de dengue *(Dengue-Net)*

La red de vigilancia dengue es un sistema de la OMS para la vigilancia estandarizada epidemiológica y de laboratorio que responde las necesidades actuales de unificar y aumentar la disponibilidad oportuna de los datos básicos del dengue para el control regional de esta enfermedad. La estrategia regional promueve la participación de todos los países en esta red mundial de vigilancia.

Actividades desarrolladas:

- Talleres para la ampliación de la implementación del Dengue-Net (Red de vigilancia global del dengue) en América.

- Abogacía en los países para la adopción del Dengue-Net como sistema estandarizado de vigilancia del dengue.

3.6 Características del Virus

3.6.1 Estructura del virus del dengue

El virus del dengue posee 10 proteínas virales en las cuales se incluye la proteína nuclear (C), las proteínas de membrana (M), la glicoproteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Todas estas proteínas se forman a partir de una gran poliproteína (5´ C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 3´), para la cual codifica el genoma del virus. El genoma del virus está constituido por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena única y aproximadamente 11 kilobases (kb) y de relativamente alta variabilidad genómica (5). Tiene un coeficiente de sedimentación de 42S y un peso molecular de 4,2 kilodaltones (kD). El ARN genómico es de polaridad positiva y funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación (5). Presenta una caperuza tipo I, con una estructura Gppp Amp cubriendo el extremo 5´ terminal, seguido por una secuencia dinucleotídica conservada AG. El extremo 3´ terminal carece de cola poliadenilada y termina con una secuencia dinucleotídica conservada CU. Los ácidos nucleicos genómicos, por sí mismos, son infecciosos (17).

3.6.2 Proteínas estructurales y no estructurales.

El genoma contiene un único marco de lectura abierto de más de 10,000 bases, flanqueado por las regiones no codificantes en ambos extremos (3´ y 5´), que codifica para un precursor polipeptídico, que por sucesivos cortes proteolíticos, genera la formación de las 10 proteínas virales a través de un procesamiento co y postraduccional (5). Los genes que codifican las tres proteínas estructurales, núcleo (C), prM (el precursor a la membrana), membrana (M), y envoltura (E), están localizados hacia el extremo amino terminal (5´) ocupando la cuarta parte de la capacidad codificadora del ARN viral. Hacia el extremo carboxilo terminal (3´) se encuentran los genes que codifican la información de las siete proteínas

no estructurales NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. El orden de las diferentes regiones del gen en el virus es el siguiente: 5'NTR-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A- NS4B-NS5-3'.NTR. La ruptura de las uniones C-prM, prM-E, ENS1, y NS4A-NS4B es realizada por la enzima signalasa retículo endoplásmica (5).

3.6.3 Genómica y factores de virulencia

3.6.3.1 Proteínas estructurales

El virión maduro contiene 3 proteínas estructurales: proteína C, proteína de la nucleocápside o núcleo; M, proteína asociada a la membrana y E, proteína de la envoltura. Los virus inmaduros contienen una proteína conocida por prM; que es un precursor de M. La proteína C es componente básico de la nucleocápside; el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción tiene un peso molecular de 13.5 kd; es rica en residuos de lisina y arginina los que le confieren un carácter altamente básico que permite su interacción con el ARN viral con el que forma la nucleocápside como componente estructural. La prM (22 kb) es el precursor glicosilado de la proteína estructural M (8 kb). La separación proteolítica de este precursor por una proteasa del aparato de Golgi, durante la maduración viral, le da origen a la formación de la proteína M. Esta escisión está ligada a la liberación del virus pero no ocurre necesariamente en todas las moléculas proteicas presentes en la membrana viral, ya que en ocasiones aparece la proteína M junto a la prM en el virión maduro (17).

Existen en 2 formas, dependiendo de la maduración del virus: Proteína pre-M (prM), célula-asociada o viriones inmaduros. La proteína M madura, es una proteína de membrana, extracelular o de virus maduros, resultado de la proteólisis de prM y eliminación de la porción amino terminal. Está estrechamente asociada a la envoltura lipídica. La formación de M a partir de prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral.

La proteína E, es una glicoproteína con un peso molecular entre 51 y 60 kD; es la mayoritaria de la envoltura, glicosilada y la más conservada; la fusión con la célula huésped es inducida por pH bajo. Está estrechamente asociada a la envoltura lipídica. Se presenta como un homodímero en la superficie del virión maduro e intracelularmente se puede encontrar como un heterodímero junto a la proteína prM en forma de prM-E. Es el componente principal de las proyecciones de la superficie del virión observadas por microscopía electrónica y contiene los determinantes antigénicos responsables de la neutralización del virus y la hemaglutinación de eritrocitos de ganso, induciendo respuesta inmunológica en el huésped infectado.

Los determinantes de la proteína E están también involucrados en la unión de los viriones a los receptores celulares y probablemente juegan un papel importante en la fusión intraendosomal a pH bajo (18).

Se ha propuesto que en ella están localizados la mayoría de los marcadores moleculares para la patogenicidad. La comparación de la secuencia nucleotídica del gen de la proteína E de los diferentes flavivirus ha mostrado una conservación perfecta de los 12 residuos de la cisteína, los cuales forman 6 puentes disulfuro (18).

3.6.3.2 Proteínas no estructurales.

Las siete proteínas virales no estructurales fueron identificadas y se confeccionaron mapas del ARN viral deducido por la secuencia amino acídica. La primera proteína no estructural (NS1), es una glicoproteína de 48 kD que contiene 2 señales del tipo Asn -X-Ser/Thr, usada para la adición de carbohidratos, estos sitios parecen estar conservados en todos los flavivirus; puede estar en forma secretada y no secretada. Es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso como una proteína monomérica y en un período corto se une formando un homodímero. Esta forma es más hidrofóbica y se desconoce si el incremento de la hidrofobicidad es un resultado de la dimerización o alguna modificación postraduccional. Una vez formado este dímero, la glicoproteína es

transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones y de aquí pasa a la superficie celular, liberándose al medio extracelular. Estudios de mutagénesis en la región C terminal de NS1, han demostrado que esta región es importante en la estabilidad y la secreción del dímero (18).

3.6.3.3 Proteína no estructural NS1

La función de la NS1 en la replicación viral no ha sido bien dilucidada. Se ha planteado que posee un papel en la replicación temprana. Basada en análisis mutacional se ha relacionado con la morfogénesis viral. A su vez, mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral. También se relaciona con la respuesta inmune específica de serotipo. La célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica, resultando importante en la protección contra la infección por flavivirus (18).

La proteína NS1 porta 2 o 3 sitios de glicosilación en las especies virales, induce una inmunidad protectora y aporta epítopos específicos de grupo y de tipo.

La proteína NS1 induce inmunidad y se considera que la inmunogenicidad es dependiente de la estructura conformacional de la molécula. La forma dimérica es más antigénica que la forma monomérica, pero se ha observado que ésta es destruida por el calor. Los anticuerpos inducidos por esta proteína son esencialmente líticos en presencia del complemento y dan la posibilidad de retardar la infección viral en los tejidos. Huang y colaboradores en un estudio realizado en 1999, demostraron un reconocimiento cercano al 45% por anticuerpos de pacientes a un péptido sintético de los primeros 15 aminoácidos de la proteína correspondientes a una región inmunodominante de la NS; así mismo demostraron que a los dos días del comienzo de los síntomas en una infección secundaria, es posible detectar anticuerpos contra este péptido (18).

En los últimos años, se han realizado estudios de pacientes con infección primaria y secundaria por dengue para definir las proteínas involucradas en el reconocimiento por anticuerpos. En pacientes con infección primaria en fase de recuperación y bajos títulos de anticuerpos IgG a la proteína E, existe reconocimiento a NS3 y NS5.

En pacientes con infección secundaria, en fase aguda, se encontraron anticuerpos IgG contra la proteína E y en fase de recuperación, altos títulos de anticuerpos IgG a otras proteínas, incluidas NS1, NS3, NS5 y C (18).

Los anticuerpos contra las proteínas E, NS3 y NS5, pueden ser detectados a los cinco días de la aparición de los síntomas. Estas tres proteínas y los anticuerpos contra ellas pueden estar involucradas en los mecanismos inmunopatogénicos de esta enfermedad. La confirmación de esta enfermedad, podría basarse en la identificación de anticuerpos contra estas proteínas no estructurales. En la mayoría de los casos con infección secundaria, en fase convaleciente, se observan anticuerpos contra las proteínas no estructurales NS3 y NS5, y en cerca del 40% contra la proteína NS1 (5).

3.6.3.4 Determinantes Antigénicos

Recientemente se ha propuesto un modelo basado en la cristalización de la proteína E del virus, según el cual, esta proteína presenta una estructura inusual cuando se compara con otras proteínas. Este modelo permite esclarecer la presentación del diversos epítopos con importantes funciones biológicas. De igual forma ha permitido establecer las bases estructurales para explicar el cambio que sufre esta proteína de estructura dimérica a una estructura trimérica, así como la importancia de este fenómeno para el reconocimiento de la proteína por diversos anticuerpos frente a variaciones de pH.

Se han podido definir grupos de epítopos empleando anticuerpos monoclonales:

a) Epítopos conformacionales, ligados a una configuración espacial de las moléculas que se juntan topológicamente a partir de los residuos elongados en la secuencia.
b) Epítopos lineares o secuenciales, independientes de la estructura tridimensional de las proteínas que presentan una especificidad de complejo reconocimiento de la secuencia en el extremo N-terminal y en el lazo del dominio B del virus del dengue (18).

3.7 Serotipos del virus del Dengue

El dengue es un arbovirus, posee cualquiera de los cuatro serotipos diferentes del virus (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4), estrechamente relacionados pero serológicamente distintos. Dentro de cada serotipo hay varias cepas y genotipos que probablemente son más o menos virulentas, pero los factores de virulencia no son toralmente conocidos aún. Cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo serotipo de por vida; aún cuando son antigénicamente similares, la infección por un serotipo, no produce inmunidad contra los otros serotipos, sólo se produce inmunidad parcial.

Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y cuadros graves que pueden conducir hasta la muerte, dada la variación genética en cada uno de los cuatro serotipos. Algunas variantes genéticas parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico. Los cuatro serotipos del virus del dengue son de amplia distribución en diversos países: Filipinas, sudeste Asiático, India, islas del Pacífico, Nueva Guinea, Australia septentrional, Grecia, Malasia y Tailandia. En América, se describe desde el Sur de Estados Unidos hasta Argentina, habiéndose descrito en forma epidémica en Cuba, Centroamérica, Trinidad y Colombia (18).

3.7.1 Distribución de los serotipos por países

- DEN-1: Caribe, Centro América, México, sur de Estados Unidos, Colombia, Nigeria, Senegal, India, Bangladesh, Filipinas y Australia.
- DEN-2: Caribe, México, Venezuela, Colombia, Senegal, Kenia, Nigeria, India, Bangladesh y Filipinas.

- DEN-3: India, Bangladesh, Filipinas, Pakistán, Sri Lanka, México, Centro América y Australia.
- DEN-4: Sureste de Asia, Sri Lanka, India, China, Centro América, Surinam, México, Colombia.

La circulación de los serotipos ha ido de ninguno o uno a múltiple, en la mayoría de los países, y en varios se ha observado la circulación simultánea de los serotipos 1, 2 y 4 durante varios años, lo que pone a estos en grave riesgo de dengue hemorrágico epidémico (19).

3.8 Hospedero del virus del Dengue

El hospedero definitivo del virus dengue es el hombre, dicho virus afecta de igual manera al sexo femenino que al masculino, encontrándose predominio de la infección en el grupo de menores de 15 años especialmente cuando la infección produce manifestaciones por fiebre hemorrágica del dengue, aunque se observa la infección por dicho virus en pacientes de todas las edades (5).

3.8.1 Inmunopatogenia

El mecanismo inmunopatológico que se desarrolla ante la infección de los serotipos de dengue, no se conoce con exactitud pero se han desarrollado modelos hipotéticos para tratar de explicar por qué un paciente puede desarrollar fiebre hemorrágica del dengue o presentar solamente fiebre del dengue. Algunos estudios refieren que si un caso ha sido infectado en una primera infección por un serotipo, especialmente el DEN-1, queda protegido contra ese serotipo, pero no contra los otros serotipos y al contrario en una infección secundaria o terciaria, los anticuerpos de la primera infección, facilitan la ayuda de estos segundos virus infectantes hacia los monocitos en donde se multiplican en gran cantidad y debilitan la membrana celular, ocasionando salida de sustancias activadoras del complemento, citoquinas y otras, que llevan a un aumento de la fragilidad capilar, ocasionando salida del plasma del espacio intravascular al extravascular, produciendo las complicaciones características de la enfermedad. También se cree que existen serotipos del virus muy agresivos, cuya virulencia se potencia en los pases sucesivos del mosquito al ser humano,

ocasionando formas severas de fiebre hemorrágica del dengue que pueden llevar a la muerte en una primo infección (5).

3.8.2 Mecanismos inmunológicos del virus dengue en el hospedero

In vitro, los anticuerpos anti-E inhiben la adhesión del virus del dengue a las células y neutralizan la virulencia, mostrando varios grados de variabilidad de reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos del virus (5).

La proteína de envoltura (E-D3), es conservada dentro de los diferentes tipos de flavivirus, esta proteína es altamente inmunogénica, altamente estable y es el dominio que los anticuerpos monoclonales y policlonales utilizan como receptor. Se ha demostrado que el segmento de la proteína E (306-314), es crítico para la virulencia de todos los serotipos del virus del dengue (5).

La proteína NS-1, se expresa en la superficie de las células infectadas, es secretada hacia la circulación como un multímero soluble y es un blanco importante para los anticuerpos contra el virus del dengue. Al mismo tiempo estos anticuerpos pueden reaccionar con células endoteliales produciendo la expresión y activación de citoquinas y moléculas de adhesión provocando lesión celular. La proteína NS-3 es el principal antígeno que estimula la reacción de las células T CD4+ y CD8+, las cuales producen niveles elevados de interferón gamma así como factor de necrosis tumoral alfa y beta y quimosinas, incluyendo el factor inhibidor de macrófagos (5). Los factores de necrosis tumoral alfa y beta son críticos en la respuesta inmunológica temprana hacia la infección por el virus del dengue mientras que el interferón gamma es crucial tanto para la respuesta temprana como para la respuesta tardía (5). En un estudio realizado por Schresta y col. (2004b), se concluyó que la actividad temprana de las células asesinas naturales, las células B y la IgM y las acciones posteriores de del interferón gamma y la IgG, probablemente tienen un rol en la defensa contra el virus del dengue.

Al momento que el virus encuentra su célula blanco, se producen una cascada de eventos, que inician con la interacción de glicoproteínas de envoltura con especificidad para la entrada de receptores y co-receptores en caso fuera

necesario, con el fin de provocar la fusión virus-célula-membrana. El virus del dengue entra en el macrófago a través de un receptor Fc como un complejo inmune. El mecanismo considerado como el responsable de la patogénesis del dengue, incluye una enfermedad inmunológica compleja, anticuerpos que reaccionan con el endotelio vascular, estimulando la producción de anticuerpos, el complemento y sus productos, mediadores solubles como citoquinas y selección de cepas virulentas. El virus del dengue se replica activamente en las células B y las induce a producir interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa. Estos estudios sugieren que las células B juegan un papel en la respuesta inmune tanto de manera temprana como de manera tardía. El hecho más importante es que el principal papel en la severidad de la sintomatología está protagonizado por las citoquinas, incluyendo predominantemente células T ayudadoras tipo I (5).

3.8.3 Antígeno Leucocitario Humano

El antígeno leucocitario humano (HLA), es un grupo de genes localizado en el cromosoma 6 en el complejo mayor de histocompatibilidad, que codifica las proteínas de superficie presentadoras de antígeno. Existen diferentes tipos de estas proteínas, las cuales pueden ser clasificadas en diversos grupos dentro del complejo mayor de histocompatibilidad I, II o III. Las proteínas codificadas por el HLA están presentes en la superficie celular de todas las células nucleadas y las plaquetas. El HLA es utilizado por las células del sistema inmunológico para diferenciar a los antígenos propios de los que no lo son. Las proteínas que son producidas dentro de este sistema, son colocadas en los antígenos HLA en la superficie de la célula. Las células infectadas pueden ser reconocidas posteriormente y destruidas por componentes del sistema inmunológico (18).

3.8.4 HLA y enfermedad por el virus del dengue

La expresión aumentada de moléculas de HLA clase I y II en células infectadas, ha sido reportada para los flavivirus, incluyendo la infección por el virus del dengue. Es posible, que la respuesta inmune generada contra péptidos virales,

presentada por moléculas de HLA, sean responsables de la inmunopatología de la infección por el virus del dengue (18).

3.8.5 HLA clase I

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos, juegan un papel importante en el control de las células infectadas por el virus del dengue. Los antígenos HLA clase I están cargados con antígenos virales derivados de péptidos junto con coestimuladores receptor/ligando, mediante interacciones entre células T CD8 + y células blanco. Para escapar del reconocimiento de los linfocitos T CD8+, los virus han desarrollado diferentes estrategias para inhibir la expresión y/o función de los mismos y han mediado respuestas inmunes en contra de antígenos endógenos y blancos infectados viralmente (18).

3.8.6 HLA y células primer

Es muy probable que la reactividad de las células T, medie la patogénesis de la enfermedad por medio de apoptosis y al inducir la secreción de citoquinas que aumentan la permeabilidad vascular (5).

3.8.7 Linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+, juegan un papel central en la regulación de celular mediante la respuesta inmune a una infección. Estas células también conocidas como células T ayudadoras, actúan sobre otras células del sistema inmune promoviendo varios aspectos de la respuesta inmune, incluyendo activación de macrófagos, aumento de la actividad de células asesinas naturales y maduración de anticuerpos (5).

Las células T CD4+ reconocen el antígeno que ha sido procesado y presentan, asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase II, a los macrófagos, células B, células dendríticas. La célula T CD4+ activada, es capaz de reconocer el antígeno presentado por cualquier célula que exprese la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad apropiada; estas células actúan liberando citoquinas en respuesta a estimulación antigénica.

La interacción entre antígenos específicos de células T CD4+ y macrófagos, desde la base de las reacciones de hipersensibilidad retardada, es uno de los mecanismos efectores principales para la eliminación de infecciones en organismos celulares (5).

3.8.8 Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ representan el antígeno específico que responde y elimina células infectadas con patógenos intracelulares tales como los virus. Cada célula en el cuerpo expresa moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y puede ser blanco de células CD8+. En general el papel de los linfocitos T CD8+ es monitorizar todas las células del cuerpo, preparándose para destruir cualquier molécula que exprese fragmentos de antígenos extraños en sus moléculas clase I (5).

3.8.9 Células Dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos profesionales para el establecimiento de la respuesta inmune primaria. Pryor et al. (2001), estudiaron la asociación entre la severidad de la enfermedad y la replicación del virus del dengue. Las células dendríticas infectadas por el virus del dengue, mostraron marcadores de maduración específicos y produjeron factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma pero no IL-6 ni IL-12; a pesar de que las células dendríticas, sufren apoptosis espontánea en ausencia de citoquinas estimulantes, este proceso aparentemente se ve retrasado después de una infección por el virus del dengue. Las células dendríticas infectadas por el virus del dengue, inducen la interacción de células T para su proliferación y producen IL-2, IL-4, IL-10 y factor de necrosis tumoral (5).

3.8.10 Factores Genéticos no HLA

Algunos estudios han investigado acerca de la asociación entre la susceptibilidad a la infección por el virus del dengue y el polimorfismo de los alelos no-HLA, como por ejemplo el receptor de Vitamina D, IL-4, IL-1 y la lectina fijadora de manosa (5).

3.8.11 Citoquinas

En numerosos estudios la frecuencia de genotipos asociados con el polimorfismo de las citoquinas ha determinado su asociación con el riesgo de un incremento de la severidad del cuadro de numerosas infecciones virales incluyendo la provocada por el virus del dengue (5).

3.9 Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas del dengue pueden dividirse en tres etapas:

- Etapa febril
- Etapa crítica
- Etapa de recuperación

La etapa febril es de duración variable (entre 3 a 6 días en niños y 4 a 7 días en adultos), está asociada a la viremia, durante la cual existe una alta posibilidad de transmisión de la enfermedad si la persona es picada por un mosquito vector. En esta etapa el paciente puede tener además de fiebre, dolor muscular y articular, cefalea, astenia, exantema, prurito, y síntomas digestivos (dolor abdominal y diarrea). Es frecuente la presencia de leucopenia con linfocitosis relativa, trombocitopenia e incremento de las transaminasas.

Algunos pacientes pueden desarrollar manifestaciones hemorrágicas leves tales como epistaxis, gingivorragias, petequias, púrpuras o equimosis, sin que correspondan a un cuadro de dengue grave. Los sangrados ginecológicos, tanto la menorragia como la metrorragia, pueden ser de intensidad variable; las pacientes pueden requerir hospitalización para una mejor observación o para un tratamiento de reposición de líquidos o de sangre, estas pacientes serán consideradas como casos de dengue grave.

El período durante el cual se produce la disminución de la fiebre y hasta 48 horas después, es el momento en el que, con mayor frecuencia, los enfermos pueden presentar complicaciones, ya que la extravasación de plasma se hace más intensa y es capaz de conducir al shock por dengue (20).

La etapa crítica, se caracteriza por la extravasación de plasma (escape de líquidos desde el espacio intravascular hacia el extravascular), que puede llevar al shock hipovolémico. Debido a la extravasación de plasma el hematocrito se incrementa, lo que constituye un método confiable para el monitoreo de la fuga de plasma.

Generalmente el shock, sólo dura algunas horas; sin embargo, también puede ser prolongado o recurrente (más de 12 o 24 horas y excepcionalmente más de 48 horas). En estos casos los pacientes pueden evolucionar a un cuadro de distrés respiratorio, así como presentar complicaciones tales como hemorragias masivas, falla multiorgánica y coagulación intravascular diseminada (CID).

Se debe vigilar la presión arterial diferencial de 20 mm Hg o menos, ya que constituye un indicador inicial de la evolución a shock junto con los signos de inestabilidad hemodinámica tales como taquicardia, frialdad y enlentecimiento del llenado capilar. Los pacientes que llegan a la etapa crítica de la enfermedad, sin un diagnóstico y tratamiento adecuado, pueden tener una mortalidad de entre el 30 al 50%.

Las plaquetas pueden descender progresivamente desde la etapa febril, pero este descenso se hace más intenso en la etapa crítica. No se ha demostrado que, en el dengue, exista una estricta correlación entre la trombocitopenia y el sangrado. No obstante, esta disminución progresiva de las plaquetas constituye una indicación para un control repetido y estricto del paciente ya que puede ser un marcador de progresión de enfermedad.

La trombocitopenia en esta enfermedad, no es debida a un déficit de producción sino a la destrucción masiva periférica, por un mecanismo inmunomediado (anticuerpos antivirales con reacción cruzada contra las plaquetas), de carácter transitorio, por lo cual inician su recuperación de manera espontánea, después de un breve período. Cuando las plaquetas comienzan a elevarse, indican que el paciente ha iniciado su mejoría.

El paciente con dengue, puede presentar en cualquier momento de su enfermedad signos y síntomas de afectación particular de algún órgano o sistema: encefalitis, miocarditis o hepatitis por dengue, así como insuficiencia renal. Estas se consideran formas clínicas graves de dengue.

En la etapa de recuperación generalmente se hace evidente la mejoría del paciente pero, en ocasiones existe un estado de sobrecarga de volumen, así como alguna infección bacteriana agregada. En esta etapa es importante vigilar sobre todo a aquellos pacientes que tengan dificultades en el manejo de los líquidos (insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca, pacientes ancianos). También puede aparecer en esta etapa un exantema tardío entre el 6º y 9º día que con frecuencia, en las palmas de las manos y las plantas de los pies y se asocia a un intenso prurito (20).

3.10 Clasificación

Actualmente existen varias clasificaciones utilizadas para la enfermedad provocada por el virus del dengue:

Durante tres décadas la OMS, ha reconocido y recomendado la clasificación del dengue en: fiebre del dengue, fiebre hemorrágica del dengue, con o sin síndrome de choque. Durante los últimos años se ha cuestionado el uso de esta clasificación por considerarla rígida y demasiado dependiente de resultados de laboratorio y no inclusiva de enfermos de dengue con otras enfermedades, por lo que en el año 2007, el Programa de Adiestramiento e Investigación de Enfermedades Transmisibles de la OMS, auspició el estudio internacional llamado Dengue Control (DENCO), que incluye en su mayoría componentes clínicos y signos de alarma útiles para mejorar el manejo de casos de dengue. Este estudio propone una clasificación binaria de la enfermedad: dengue y dengue severo (21). También se reconoce la clasificación por el índice de severidad del estadío clínico (ISEC) (22): esta clasificación, le asigna al paciente de una puntuación según los signos clínicos y/o hallazgos de laboratorio, considerando cuatro grados de severidad:

- **Leve**: sintomatología característica de dengue sin manifestaciones hemorrágicas.
- **Moderado**: características de enfermedad leve más manifestaciones hemorrágicas cutáneas
- **Severo o grave**: características de enfermedad moderada con hematemesis, melena, o hemorragia vaginal.
- **Complicado o muy grave**: características de enfermedad severa con uno o más de los siguientes hallazgos: derrame pleural, ascitis, descenso del hematocrito en más del 20% luego del hematocrito inicial.

Este índice considera los síntomas y signos cardinales, así como los signos paraclínicos relevantes del paciente desde el día de inicio de los síntomas, ha sido modificado en numerosas ocasiones para realizar la evaluación por criterio clínico; actualmente se utiliza esta clasificación con algunas modificaciones del estudio Dengue Control (DENCO) (21).

3.11 Diagnóstico

3.11.1 Diagnóstico clínico

La enfermedad producida por el virus dengue, se diagnostica clínicamente en base a signos y síntomas que presenta el paciente según la definición de caso sospechoso de la OPS, que se define como, todo paciente con enfermedad febril aguda con duración de hasta 7 días y que presenta dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: cefalea, dolor retroorbitario, mialgias, artralgias, erupción cutánea, y leucopenia, con manifestaciones hemorrágicas; dentro de las manifestaciones hemorrágicas podemos encontrar petequias, hemorragia gingival, epistaxis, hemorragia gastrointestinal especialmente en los casos de dengue severo o en caso de pacientes con fiebre hemorrágica por dengue (6).

3.11.2 Diagnóstico por laboratorio

El diagnóstico de laboratorio es esencial para la confirmación del dengue; éste incluye técnicas de aislamiento e identificación del virus, diagnóstico serológico y de biología molecular (detección del ARN del virus del dengue).

La detección de antígenos virales en sueros virémicos es necesaria para las investigaciones clínicas y epidemiológicas y debe realizarse rápidamente para implantar tempranamente el tratamiento anti-choque a los enfermos y para la detección precoz de un brote (5).

3.11.3 Diagnóstico viral. Técnicas diagnósticas

El diagnóstico viral en el laboratorio incluye:

- **Técnicas directas para la demostración viral:**

Dentro de estas se encuentran, las que visualizan la partícula viral o su efecto celular específico como las tinciones para microscopía de luz, la microscopía electrónica y el cultivo o aislamiento viral (los más empleados son cultivos primarios, cepas de células diploides y líneas celulares). Las pruebas para demostración de antígenos virales, que permiten descubrir y caracterizar un virus en cultivo celular cuando todavía no se produce el efecto citopático, o éste no es evidente o en los casos en que el virus se debe reconocer por otras propiedades o características en cultivo: como la hemadsorción y la inmunofluorescencia directa (IFA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y las pruebas de látex. Las que evidencian o descubren el material genético específico viral conservado y replicable ya sea que se encuentre en un fluido, en una célula o tejido, ya sea activo o latente: ensayos de amplificación genética (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, reacción en cadena de la ligasa o LCR, sistema QB replicasa, ADN ramificado (branched o bADN) e hibridización (sondas) (10).

- **Técnicas indirectas para el descubrimiento viral.**

Son técnicas serológicas tradicionales para descubrir anticuerpos contra determinado agente viral, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos. Estos ensayos se pueden clasificar en tres grupos con base en la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo:

a) Los que dependen de la capacidad del anticuerpo que se une al antígeno para ejercer alguna función no relacionada con el virus, por ejemplo: la fijación del complemento (FC), hemaglutinación indirecta (HI), aglutinación por látex.
b) Los que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica como la neutralización, la inhibición de la hemaglutinación (IH), la inhibición de la neuraminidasa (que mide la capacidad de los anticuerpos para bloquear la infectividad viral), la hemaglutinación viral y la actividad de neuraminidasa.

c) Los que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo como por ejemplo: la IFA indirecta, el RIA, ELISA, Inmunoblot y Western Blot (10).

3.11.4 Detección del antígeno

Por diferentes investigaciones se ha podido constatar, que la viremia ocurre en la etapa temprana del período febril del dengue y su eliminación es cuando disminuye la fiebre y aumentan los niveles de anticuerpos (10).

3.11. 5 Aislamiento e identificación del virus

Para la técnica del aislamiento del virus, se debe obtener una muestra de suero tan pronto sea posible o dentro de 5 días después de la fecha del comienzo de síntomas, ya que se ha podido constatar que el período virémico se encuentra entre los días 4 y 5 después del comienzo de los mismos. Es una técnica útil y sensible para la confirmación de la infección por el virus de dengue, sobre todo si se toma la muestra antes de que desaparezca la fiebre. Aunque el dengue es una de las principales enfermedades virales en el hombre, sus cuatro serotipos se consideran entre los que mayores dificultades tienen para su aislamiento y multiplicación en el laboratorio. Entre estas técnicas se encuentran:

- Aislamiento viral en ratones: la inoculación intracerebral de la muestra en ratones recién nacidos (1 ó 2 días) es el método tradicional y a su vez el menos sensible, para el aislamiento del virus.
- Aislamiento en células de cultivos y en mosquitos: las técnicas de cultivo de tejidos en aislamiento de los virus del dengue aumentó considerablemente su eficacia, aunque todavía no se ha encontrado ninguna línea celular de mamíferos o de mosquitos en donde todas las cepas del virus dengue produzca un efecto citopatogénico (10).

Varias líneas celulares de mamíferos se han usado con distintos grados de sensibilidad, para el aislamiento de estos virus. Las células de mosquitos se han utilizado en forma creciente ya que resultan mejores para el aislamiento pues son más sensibles, fáciles de multiplicar y mantener a

temperatura ambiente, se mantiene hasta 14 días sin necesidad de cambiarles el medio de cultivo y pueden llevarse al terreno y ser inoculadas directamente con suero de pacientes. La inoculación de mosquitos adultos, es el método desde el punto de vista técnico, que resulta más sensible para el aislamiento viral; el *aedes albopictus* y el *toxorinchites splendens* son los utilizados.

A pesar de esta ventaja el método de elección analizando la sensibilidad del sistema y la factibilidad de su realización es el aislamiento en línea celular C6/36 que se logra en un porcentaje relativamente alto y al mismo tiempo es sencillo en su ejecución pues la inoculación de mosquitos resulta engorroso ya que requiere habilidades especialidades y el tener las colonias en insectarios, que son instalaciones relativamente costosas y no frecuentes en nuestra región. En aislamientos virales en muestras con infección primaria el número de casos positivos oscila entre el 51 y el 100%, demostrándose, además, que es en estos pacientes donde se encuentran los mayores títulos de antígeno (10).

3.11.6 Aislamiento e identificación viral
(Tomado del Manual utilizado en el IPK Cuba)

Este procedimiento consta de los siguientes pasos:

I. Multiplicación de células C636
II. Congelación de células C636
III. Descongelación
IV. Aislamiento viral
V. Identificación viral por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Las células fluorescentes se observarán cuando hay una reacción con el monoclonal específico. Un aislamiento positivo confirma un caso de dengue. Lo ideal en un procedimiento diagnóstico es la detección de antígenos virales en muestras clínicas, seguido por su identificación. El aislamiento y tipificación de virus permite la detección e identificación específica del dengue, pero su sensibilidad depende mucho de una adecuada recolección y

conservación de la muestra, y requiere de 5 a 10 días para dar resultados apareados. El método más sensible, rápido y económico de identificación del virus es mediante la inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra los cuatro serotipos del virus (10).

3.12 Diagnóstico Serológico

Para el diagnóstico serológico, se requiere una muestra de suero en la etapa de recuperación obtenida al menos 6 días después de la fecha de comienzo del primer síntoma.

En estudios recientes en infecciones primarias sobre la cinética de la respuesta de anticuerpos, se demostró el incremento de los de tipo IgM en prácticamente todos los pacientes, a los dos días de la disminución de la fiebre; con un pico en la respuesta aproximadamente a las dos semanas. En infecciones no primarias, la respuesta de anticuerpos IgM es variable, en algunas ocasiones está ausente o es muy baja pero existe un marcado incremento de los de tipo IgG.

Tan pronto como surgió el método ELISA fue evaluado para los flavivirus. Las desventajas de este método son su baja sensibilidad, pues requiere de títulos muy altos de virus para obtener una correcta identificación y que no reaccionen con cepas de cierta distribución geográfica. En el caso de los virus del dengue esta sensibilidad fue extremadamente baja.

Estos virus propagados en células de mosquito pueden ser identificados fácilmente utilizando anticuerpos monoclonales tipo específico, pero estos métodos son muy laboriosos. Los ensayos ELISA para el diagnóstico incluyen los típicos ensayos de captura en fase sólida para la detección de anticuerpos IgM e IgG y la detección de anticuerpos IgE e IgA en suero, plasma o saliva (10).

3.12.1 Inmunoensayo enzimático (ELISA) de captura para IgM anti-dengue

Es el método de elección por su economía, sencillez y relativa rapidez. Es de gran utilidad para el trabajo durante epidemias y constituye el sistema de elección para la vigilancia epidemiológica ya que tiene una elevada sensibilidad y especificidad, sin embargo, no permite identificar los serotipos

circulantes. Permite un diagnóstico rápido empleando una sola muestra colectada en fase aguda, el diagnóstico temprano de esta enfermedad se puede mejorar, si se colecta una segunda muestra alrededor del séptimo de iniciados los síntomas.

Los resultados de esta técnica deben interpretarse con cuidado, porque dependen en gran medida del momento en que se tome la muestra y del tipo infección (primaria o secundaria) que presente la persona afectada. Los anticuerpos IgM se desarrollan rápidamente durante la infección (la positividad a IgM se ha reportado en el 98% de las muestras con dengue en fase de recuperación) y son detectables a partir del quinto día del comienzo de los síntomas, durando en sangre hasta 3 meses aproximadamente por lo que los sueros convalecientes deberán ser colectados antes de que la IgM alcance niveles no detectables. La detección de anticuerpos IgM anti-dengue indica una infección activa o reciente (10).

3.12.2 ELISA de captura de IgM

Las tiras son sensibilizadas con una inmunoglobulina de carnero anti IgM humana, que reaccionará con los anticuerpos de clase IgM presentes en la muestra del paciente. Al adicionar el antígeno del virus del dengue éste reaccionará con las inmunoglobulinas M capturadas si estas son específicas para el virus. Posteriormente se adiciona el conjugado, formado por inmuglobulinas anti virus dengue acopladas a la enzima peroxidasa del rábano, que reaccionará con el antígeno del virus. Cuando se adiciona el substrato, este es degradado por la enzima peroxidasa traduciéndose en un cambio de color en la reacción en las muestras positiva (23).

3.12.3 MAC-ELISA (captura de anticuerpos IgM anti-dengue)

Es el sistema propuesto por la OPS, por su elevada especificidad, sensibilidad y rapidez en su ejecución. Es una herramienta de gran valor para la vigilancia serológica de la fiebre del dengue y la FHD y es la prueba serológica seleccionada por la mayoría de los laboratorios. Es apropiada para el análisis de sueros individuales colectados 5 o más días después del inicio de la enfermedad (MAC-ELISA) (23).

3.12.4 Prueba de neutralización por reducción de placas

Es costosa y laboriosa y pocos laboratorios la tienen normalizada en la región. Es muy útil para estudios retrospectivos para tratar de discernir los serotipos circulantes en una determinada región o grupo poblacional (23)

3.12.5 Titulación del virus del dengue y neutralización por reducción de placas

(Morens et al. Tomado del Manual de Procedimientos del IPK. Cuba).

Técnica de elevada especificidad, útil para la identificación viral y para la detección de anticuerpos contra el virus del dengue. Para esta prueba los virus pueden ser aislados en cualquier sistema aunque en ocasiones es necesario realizar un pase por una línea de células de mamífero permisiva. La utilización de células BHK 21 en la técnica de placas ha brindado resultados satisfactorios y rápidos (23).

3.13 Diagnóstico confirmatorio

La inhibición de la hemaglutinación y la fijación del complemento son específicas y sensibles pero más trabajosas y requieren de sueros pareados para la confirmación de los casos (23).

3.13.1 Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación

(Método de Clark y Casals)

Algunos antígenos virales tienen capacidad para aglutinar eritrocitos de diversas especies, sin embargo la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente evitan la aglutinación de los eritrocitos por tales antígenos; cuando esto ocurre se evidencia la presencia de anticuerpos. El virus del dengue aglutina a eritrocitos de ganso y humanos del grupo O.

Producto de la infección del virus se forman anticuerpos que se unen al virus e inhiben la hemaglutinación. El título de un suero es considerado como la última dilución donde se inhibe la hemaglutinación (10).

3.14 Otras Técnicas

3.14.1 Técnicas Moleculares

El desarrollo de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa es claramente uno de los principales avances técnicos en el diagnóstico de las enfermedades virales. La habilidad para amplificar millones de veces una mínima cantidad de ácido nucleico provee a la técnica de un poder extraordinario (10).

3.14.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Está utilizándose en forma creciente para el diagnóstico de los flavivirus y específicamente para el diagnóstico de los virus del dengue. Mediante esta técnica, el ARN viral es detectado en casi un 90%. Es una técnica de diagnóstico muy útil debido a su sensibilidad, especificidad y detección rápida de cantidades mínimas de material genético viral en las muestras de pacientes. Además permite evidenciar una infección aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica, lo que permite disminuir la transmisión de estas infecciones. Utilizando la PCR se han detectado directamente los virus del dengue en sueros de pacientes, en mosquitos infectados en sobrenadantes de cultivo infectados y en larvas de mosquitos. Además, permite el estudio de las características genéticas de las cepas circulantes y detectar el ácido nucleico viral en los tejidos de pacientes fallecidos por dengue. La PCR potencializa la rapidez en el diagnóstico, pero requiere facilidades especiales y equipamientos muy caros (10).

3.14.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)

Variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea un molde de ADN, un par de cebadores específicos, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a la mezcla se le adiciona una muestra marcada con fluoruro que, en un termociclador con sensores para medir fluorescencia tras ser excitado a una longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación razón por la cual se le denomina PCR en

tiempo real. En muchos casos el molde que se emplea para la PCR cuantitativa no es desde el principio ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real o RT-Q-PCR (10). Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas, todavía no se ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra (15).

3.14.4 Transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Es un método *in vitro* que utiliza la síntesis enzimática para replicar selectivamente una región diana dentro de un ADN de doble cadena, de forma similar la amplificación de ARN puede ser hecha proporcionando una copia de ADN complementario (ADNc) que haya sido previamente sintetizada por una transcriptasa inversa. El principio fundamental es la amplificación de un fragmento específico de ADN, por medio de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial, hasta llegar a obtener una cantidad adecuada del producto, el cual puede ser visualizado por electroforesis. Una sola molécula puede generar más de un millón de copias de sí misma luego de 30 ciclos de replicación exponencial (10).

Está comprendida de tres reacciones consecutivas, la desnaturalización, la hibridación y la polimerización, elongación o extensión. Después de varios ciclos el producto predominante de la reacción será aquella pieza de ADN la cual está flanqueada por los cebadores e incluirá a los cebadores por sí mismos (17).

3.14.5 Versiones de RT-PCR:

- Se amplifica segmentos de la región de la cápside viral.
- Se amplifica parte de la región no estructural del virus, NS3.
- El PCR *nested* o doble PCR o PCR anidada, en la que se hacen dos amplificaciones sucesivas a partir del producto inicial obtenido, en la primera se amplifica una región amplia del virus del dengue conservada en los 4 serotipos y en la segunda diferentes regiones específicas para cada serotipo (23).

Una muestra positiva es aquella donde se logra amplificar un fragmento de ADNc con el tamaño esperado. Un caso positivo por RT- PCR de dengue es un caso confirmado de dengue. El RT-PCR es una prueba de diagnóstico útil y más sensible que el aislamiento del virus y titulación directa del virus para la confirmación de infección de virus de dengue en la infección secundaria, así como en la infección primaria, sobre todo cuando las muestras del plasma son obtenidos antes de que la fiebre desaparezca.

La amplificación de los ensayos inmunoenzimáticos fluorogénicos ha sido descrita para la detección e identificación del dengue 3 en muestras de sueros. Este ensayo emplea placas recubiertas con anticuerpos monoclonales contra dengue 3. Una vez incubada la muestra se adicionan anticuerpos monoclonales contra dengue biotinilados y seguidamente la beta galactosidasa estreptavidina. Esta técnica da la posibilidad de combinar el efecto de amplificación de las interacciones biotina estretavidina con una alta sensibilidad en la detección fluorogénica, gracias a la alta afinidad de la biotina por sus enlaces multivalentes a la estreptavidina unida a la beta galactosidasa. Después de la optimización de este procedimiento se redujeron las interacciones inespecíficas a las proteínas y se incrementaron los enlaces específicos por el antígeno. El ácido nucleico del virus de dengue puede detectarse con sondas específicas de ADNc o sondas sintéticas de oligonucleotidos. Estas técnicas, usadas con sondas específicas de serotipo y topotipo, serán potencialmente útiles no sólo para la identificación sino también para hacer investigaciones epidemiológicas del movimiento de ciertos topotipos (23).

3.15 Fiebre Hemorrágica del Dengue

Cada año se reportan hasta 250,000 casos de dengue hemorrágico y su incidencia se ha cuadriplicado desde 1985 (24).

En algunos casos una segunda infección con cepa distinta del virus dengue de una primoinfección, produce fiebre hemorrágica del dengue que se acompaña de choque grave (20). No obstante los casos de dengue hemorrágico pueden ocurrir por infección primaria y esto depende principalmente del serotipo. Los serotipos DEN-2 y DEN-3 son los que más casos severos causan, seguidos por el DEN-1 y DEN-4 (11).

En 1981 y 1994 se introdujeron cepas de DEN-2 genotipo III y DEN-3 genotipo III, respectivamente, las cuales ocasionaron la mayoría de casos hemorrágicos en países asiáticos. La primera epidemia de dengue hemorrágico en América ocurrió en Cuba con 10,312 casos y 158 muertes y la segunda se asoció con más casos severos en Panamá y Nicaragua (11).

La fiebre hemorrágica del dengue se produce cuando los anticuerpos no neutralizantes estimulan la entrada de los virus en los macrófagos, lo que activa los linfocitos de memoria T, provocando la secreción de citocinas inflamatorias e inicia las reacciones de hipersensibilidad. Estas reacciones provocan una debilidad y rotura de los vasos sanguíneos, hemorragia interna y pérdida del plasma, lo que da lugar a síntomas de shock y hemorragia interna (19).

3.15.1 Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones hemorrágicas del dengue son debidas a la pérdida del plasma debido al aumento de la permeabilidad vascular, lo que ocasiona aumento del hematocrito y presencia de colecciones líquidas en cavidades serosas (derrame pleural, ascitis y derrame pericárdico) (18,24).

La FHD (fiebre hemorrágica del dengue) se caracteriza por cuatro manifestaciones principales: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia (aunque no se presenta en todos los casos) y a menudo, insuficiencia circulatoria. La principal alteración patofisiológica que determina

la gravedad de la FHD y que la distingue del dengue clásico, es la extravasación del plasma, que se manifiesta por un creciente valor del hematocrito y hemoconcentración. La enfermedad generalmente comienza con una elevación súbita de la temperatura, acompañada de congestión facial, anorexia, vómitos, cefalea y dolores musculares y articulares; frecuentemente hay dolor epigástrico.

Los fenómenos hemorrágicos más comunes son una prueba de torniquete positiva (>20 petequias/cm3, o prueba de Rumpel Leed), equimosis, epistaxis, hemorragias gingivales y hemorragias en los sitios de punción venosa. Ocasionalmente se observan hemorragias gastrointestinales ligeras.

Durante la fase febril pueden aparecer petequias diseminadas en las extremidades, las axilas, la cara y el paladar blando; también se puede observar un exantema maculopapular o del tipo de la rubéola. En los casos leves o moderados, después de ceder la fiebre desaparecen todos los signos y síntomas. El descenso gradual de la temperatura puede acompañarse de sudores profusos y alteraciones leves de la frecuencia del pulso y de la presión sanguínea, frialdad de las extremidades y congestión cutánea; estas manifestaciones son el reflejo de leves y transitorios trastornos circulatorios, como consecuencia de cierto grado de extravasación del plasma. Los pacientes pueden recuperarse espontáneamente o después de tratamiento con líquidos y electrolitos (25).

3.15.2 Clasificación por gravedad de la fiebre hemorrágica del dengue

Grado I: fiebre y síntomas generales
Grado II: hemorragia espontánea (generalmente cutánea)
Grado III: insuficiencia circulatoria (hipotensión)
Grado IV: Choque (24)

3.15.3 Criterios de hospitalización para dengue hemorrágico

Piel marmórea, disminución de pulsos periféricos, llenado capilar mayor de 3 segundos, Presión arterial diferencial disminuida, alteraciones del estado mental, taquicardia, hipotensión y oliguria (24).

3.15.4 Signos de alarma para fiebre hemorrágica del dengue

Dolor abdominal intenso y sostenido, vómitos persistentes, coma, choque, insuficiencia ventilatoria, hemorragia y cianosis, derrame seroso detectado por clínica, hipoalbuminemia, hepatomegalia mayor de 2 cm, aumento brusco del hematocrito concomitante con rápida disminución del recuento de plaquetas (10).

3.16 Tratamiento

La evaluación inicial del paciente con dengue definirá si el tipo de atención que necesita será ambulatoria u hospitalaria; y qué decisiones clínicas y terapéuticas deben ser tomadas. Según las cuatro categorías de la clasificación, el lugar de tratamiento del paciente será (20):

Categoría de la Clasificación	Lugar de Tratamiento
Dengue sin signos de alarma ni otras enfermedades	Ambulatorio
Dengue con otras enfermedades de base	Seguimiento estricto ambulatorio o internación en Sala General
Dengue con signos de alarma	Internación en Sala General
Dengue Grave	Internación en Sala de Cuidados Intensivos

Tomado de: Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología. Guía para el equipo de salud No. 2.[en linea] Argentina: MSAL . [accesado 13 de mayo 2010] . Disponible en: www.msal.gov.ar

3.16.1 En pacientes con dengue sin signos de alarma y sin enfermedades de base

El tratamiento puede ser domiciliario, indicando al paciente y su familia que concurra al centro de salud si aparecen los signos de alarma: dolor abdominal intenso o sostenido, vómitos abundantes y frecuentes, manifestaciones hemorrágicas, irritabilidad, somnolencia o ambos. Se debe indicar reposo y reposición de líquidos de contenido electrolítico por vía oral. En menores de 6 meses, continuar con lactancia materna, aumentando la frecuencia según demanda. En niños mayores de 6 meses continuar alimentación habitual. Se debe proteger al paciente de la picadura de mosquitos mientras se encuentre febril, para evitar la transmisión viral. Se puede indicar paracetamol para el dolor y la fiebre, los AINES están contraindicados (20).

En lo posible estos pacientes deben ser evaluados diariamente buscando signos de alarma, particularmente desde el inicio de la disminución de la fiebre hasta 48 horas después.

Se debe brindar información acerca de la enfermedad, su modo de transmisión y la forma de prevención tanto al paciente como a su familia. Entre las medidas a tomar se encuentran:

- Reposo relativo en cama, con aislamiento.
- Adecuada ingesta de líquidos (2 litros o más por día).
- Paracetamol
    - Adultos: 500mg cada 6 horas, máximo 2 gramos por día.
    - Niños: 10 a 15 mg/Kg/día.
- No usar antiinflamatorios no esteroideos.
- No administrar antibióticos ni corticoides.
- Evitar medicamentos por vía intramuscular.
- Dar la información oral y escrita sobre signos de alarma, medidas de prevención y contraindicaciones.

Para el seguimiento del paciente se deben tomar en cuenta:

- Control diario.
- Buscar signos de alarma en cada consulta hasta 48 horas posteriores al cese de la fiebre.
- Buscar signos y síntomas de mejoría clínica.
- Hemograma diario, si es posible, o cada dos días.

3.16.2 En pacientes con dengue sin signos de alarma con enfermedades de base o riesgo social

El tratamiento de este grupo de pacientes puede ser hospitalario ya que los pacientes con dengue sin signos de alarma que tienen condiciones co existentes (como por ejemplo, embarazo) o que tienen riesgo social, pueden requerir una atención diferente que, en muchos casos, no es factible brindar en el domicilio.

Enfermedades tales como obesidad, diabetes mellitus, enfermedades hematológicas crónicas y cualquier otra enfermedad crónica, pacientes que reciben tratamiento mantenido con anticoagulantes o corticoides, o embarazadas pueden, asociadas al dengue, hacer más complicado su manejo. La misma situación puede darse con personas ancianas con dengue o con niños y niñas muy pequeños.

Otras condiciones que pueden requerir un manejo diferente de los pacientes con dengue sin signos de alarma son las de riesgo social, incluyendo aquellas causas que dificultan el seguimiento del paciente, ya sea por la residencia lejana u otro factor como vivir solo o en condiciones de pobreza extrema.

En el caso de que el paciente con dengue no tolere la vía oral, se indica hidratación endovenosa a 2-3 ml/kg, controlando las condiciones co existentes, como la insuficiencia cardiaca, la insuficiencia renal, la edad avanzada, en las que se debe controlar la expansión cuidadosamente.

En niños el volumen de líquido necesario es similar al del tratamiento de la diarrea con una deshidratación isotónica leve o moderada (déficit del 5 al 8%): 20-30 ml/kg cada 30 minutos vía oral.

Se debe controlar la aparición de signos de alarma, y proteger al paciente de las picaduras de mosquitos, mientras se encuentre febril, para evitar la transmisión viral.

El manejo de fluidos para adultos, se recomienda de la siguiente manera:

- Hidratación vía oral de acuerdo a condición preexistente.
- Si no tolera la vía oral, iniciar hidratación endovenosa con cristaloides a 2-3 ml/Kg, de acuerdo a condiciones preexistentes.
- Aislamiento de los mosquitos.
- Vigilancia clínica específica según el tipo de condición asociada.
- Tratamiento sintomático igual que para los casos ambulatorios.
- Dar la información oral y escrita sobre medidas de prevención y contraindicaciones a sus familiares.

A los pacientes incluidos en este manejo se deben tomar en cuenta:

- Control de signos vitales con balance hídrico.
- Buscar signos de alarma hasta 48 horas después del cese de la fiebre.
- Hemograma diario.
- Vigilar condiciones asociadas (20).

3.16.3 Pacientes con dengue con signos de alarma y con criterios para dengue grave

En los casos en los que el paciente presenta signos de gravedad, se debe expandir enérgicamente al paciente y evaluar estrechamente su evolución controlando:

- Signos vitales
- Llenado capilar
- Hematocrito
- Diuresis

Si el paciente se encuentra en un servicio de salud ambulatorio, iniciar la expansión endovenosa obteniendo el hematocrito antes de iniciar la expansión de volumen de la siguiente manera:

- Iniciar solución fisiológica Lactato de Ringer a 20ml/Kg en 15-30 minutos. Si el paciente mejora se continua infusión con la misma solución a 10ml/Kg por 1 hora. Si sigue la mejoría se debe continuar reduciendo el goteo.
- Si el paciente no mejora y el hematocrito sigue alto, repetir el procedimiento de expansión (20ml/Kg 15-30 minutos).
- Si no mejora y el hematocrito continúa elevándose, iniciar coloides, 10-20ml/Kg en 30-60 minutos. Si mejora se cambia a soluciones cristaloides, 10ml/Kg en 1 hora. Si no mejora, continuar con coloides 10-20ml/Kg en 1 hora. Y si después de todos los procedimientos antes propuestos el paciente no mejora se considera el uso de aminas vasoactivas más la necesidad de transfusión sanguínea (20).

4. METODOLOGÍA

4.1Tipo y diseño de investigación

Descriptivo (26).

4.2 Unidad primaria de muestras

1. Paciente con sospecha clínica de dengue de toda edad y ambos sexos, que asistió a los Servicios de Salud públicos y privados del municipio de Gualán Zacapa.

2. Paciente que durante el período estudiado fue ingresado en el Hospital Regional de Zacapa con impresión clínica de dengue y/o manifestaciones hemorrágicas de dengue.

4.3 Unidad de análisis

4.3.1 Marco muestral

Pacientes de toda edad y ambos sexos que habitan en el municipio de Gualán Zacapa y todos aquellos pacientes hospitalizados con caso sospechoso de dengue en el Hospital Regional de Zacapa.

4.3.2 Selección de los sujetos a estudio

Se tomó en cuenta a todos los pacientes que durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, cumplieron los criterios de caso sospechoso de dengue definido por la OPS y que asistieron a los servicios de salud del municipio de Gualán Zacapa o fueron hospitalizados en el Hospital Regional de Zacapa.

4.3.3 Métodos y técnicas de muestreo.

Muestreo no probabilístico (26).

4.4 Criterios de exclusión

- Paciente con cuadro clínico sospecho de dengue que presentara inmunosupresión.
- Paciente sospechoso de dengue o dengue severo y con diagnóstico previo de: hemofilia, púrpura trombocitopénica idiopática, policitemia o lupus eritematoso sistémico.
- Paciente sospechoso de dengue o dengue confirmado intervenido quirúrgicamente en las últimas 48 horas previo a la toma de muestra

4.5 Definición y Operacionalización de Variables

Variable	Definición	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala	Instrumento de medición
Caso sospechoso de dengue	Todo paciente que presente enfermedad febril aguda con duración de hasta 7 días, y que se acompaña de 2 ó más de los siguientes síntomas: fiebre, Cefalea, dolor retrorbitario, mialgias, artralgias, erupción cutánea, manifestaciones hemorrágicas leves, leucopenia	Todo paciente con características clínicas, que tenga fiebre, artralgias, dolor retroocular, mialgias, manifestaciones hemorrágicas o erupción cutánea leve.	Cualitativa	Nominal	Interrogatorio y Examen Físico
Caso confirmado de dengue	Todo caso sospechoso confirmado por laboratorio por detección de IgM anti dengue	Paciente con IgM anti dengue y/o PCR positiva	Cualitativa	Nominal	Test de ELISA y/o PCR

	y/o PCR.				
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento	Edad en años proporcionada por el paciente		Nominal	Dato proporcionado en la ficha clínica
Serotipo del virus del dengue	Tipo serológico de un determinado organismo clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie.	Identificación de serotipo viral mediante PCR en DEN-1, DEN-2, DEN-3 Y DEN-4	Cualitativa	Nominal	Determinación de serotipo por medio de reacción en cadena de la polimerasa
Proteína de liberación NS1	Proteína no estructural de expresión de la superficie celular de las células infectadas por virus dengue.	Determinación de anticuerpos contra proteína NS1	Cualitativa	Ordinal	Reacción positiva para anticuerpos contra proteína NS1

4.6 Instrumento, procedimientos y técnicas

4.6.1 Instrumento de recolección de datos

4.6.1.1 Ficha clínica de "caso sospechoso de dengue":

En la ficha clínica se solicitó los nombres y apellidos completos de los participantes en el estudio, además de edad, sexo, procedencia, inicio de síntomas, fiebre cuantificada, artralgias, mialgias, manifestaciones hemorrágicas (Signo de Rumpel Leed) y dolor retroorbitario, estos datos, fueron anotados en el instrumento, además de incluir la evaluación clínica

de cada paciente. Los datos generales de la ficha clínica se utilizaron para la identificación posterior de las muestras (ver anexo I).

4.6.2 Procedimientos:

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes fases:

4.6.2.1 FASE I

- Logística: Se solicitaron los permisos respectivos a autoridades gubernamentales, municipales, comunitarias y de salud para la realización del estudio.

- Divulgación: Se visitó al personal médico del sector público y privado y se informó acerca del estudio, se solicitó la colaboración de ambas entidades, para la identificación de pacientes con caso sospechoso de dengue.

- Promoción: una semana previa al inicio de la realización del trabajo de campo los 5 integrantes del grupo de tesis realizaron promoción en áreas estratégicas, incluyendo anuncios a través de canales de comunicación y audiovisuales.

4.6.2.2 FASE II

- **Distribución:** Se trabajó de lunes a jueves, en horario de 9:00 a 16:00 y se distribuyó a los integrantes del grupo de la siguiente manera: 1 integrante de grupo se ubicó en el Centro de Salud de Gualán Zacapa, 2 integrantes se ocuparon de la búsqueda activa de casos en el municipio y 2 integrantes se ubicaron en el Hospital Regional de Zacapa.

- **Identificación:** *En la comunidad:* se solicitó al personal médico de los servicios de salud tanto públicos como privados del área de estudio, que al identificar un caso febril fuera referido al Centro de Salud de Gualán Zacapa; tres integrantes del grupo

realizaron búsqueda activa de casos febriles los que fueron evaluados clínicamente para determinar si llenaban los criterios de caso sospechoso de dengue en las aldeas del municipio de Gualán. *En el Hospital:* Al mismo tiempo se identificaron pacientes ingresados en los diferentes servicios con impresión clínica de dengue.

- Se clasificó por clínica a los pacientes y previo consentimiento informado firmado por el mismo se procedió a tomar la muestra sanguínea.

- **Preparación para la toma de muestra:** se tomaron en cuenta todas las normas de bioseguridad vigentes tanto para pacientes como para personal médico encargado de tomar las muestras con utilización de guantes, batas y realización de asepsia y antisepsia antes de la toma de muestra.

- **Toma de muestra:** previo a la toma de muestra se rotularon los tubos de ensayo con nombres, apellidos y fecha de toma de muestra así como el lugar donde se contactó al paciente, luego se procedió a tomar una muestra de sangre venosa en brazo izquierdo a todos los pacientes que participaron en el estudio, tomando un total de 8 a 10 mililitros de sangre para adultos y de 2 a 4 mililitros para niños y colocada en un tubo de ensayo sin anticoagulante para luego ser centrifugadas en el laboratorio del Centro de Salud de Gualán y en el laboratorio del Hospital Regional de Zacapa.

- **Transporte de muestras:** previa centrifugación, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 grados centígrados en el laboratorio del Hospital Regional de Zacapa para los casos hospitalarios y en el laboratorio del Centro de Salud de Gualán, para las muestras comunitarias; luego fueron transportadas en termos a una temperatura de 8 grados centígrados (con finalidad de preservar la cadena de frío se utilizaron termómetros dentro

de los mismos) , y posteriormente procesadas en el Laboratorio Nacional de Salud, entregándolas el último viernes de cada semana epidemiológica.

- **Recepción de muestras en el Laboratorio Nacional:** junto con los sueros de las muestras previamente centrifugadas, se entregó copia del instrumento de recolección de datos y copia de ficha epidemiológica del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), confirmando mediante listado previamente elaborado que no faltara ninguna muestra, luego se obtuvo fecha y sello del Laboratorio Nacional, así como firma de la persona que recibió las mismas.

4.6.2.3 FASE III:

- **Técnicas utilizadas:** todas las muestras obtenidas se procesaron en el Laboratorio Nacional de Salud, de la siguiente manera: si la enfermedad se encontraba dentro de los primeros 3 días se realizó PCR y serotipificación, si el paciente había referido tener 4 o más días con la enfermedad se realizó IgM anti-dengue por medio de ELISA. A los pacientes con manifestaciones hemorrágicas provenientes del hospital se les realizó determinación de anticuerpos contra proteína NS1. A todas las muestras hospitalarias por protocolo del Laboratorio Nacional de Salud, se les realizó serología y PCR.

- **Reacción en cadena de la polimerasa:** se realizó PCR para obtener la serotipificación de las muestras de todos los pacientes hospitalizados y de los casos sospechosos detectados en la comunidad según la fecha de inicio de síntomas.

- **IgM para ELISA:** se determinó la concentración de IgM anti dengue por método de ELISA a los participantes que presentaron sospecha clínica de dengue de más de 5 días de evolución a nivel comunitario y a todas las muestras de los

participantes con impresión clínica de dengue con o sin inmunocromatografia en placa en el Hospital Regional de Zacapa.

- **Proteína NS1:** se determinó por medio de anticuerpo monoclonal a pacientes hospitalizados con diagnóstico de dengue en el Hospital Regional de Zacapa. Originalmente se planteó examinar las muestras sanguíneas de pacientes con dengue severo en búsqueda de esta proteína, con el objetivo de analizar la presencia de ésta en pacientes hospitalizados pero por criterios internos del laboratorio Nacional de Salud, únicamente se seleccionaron 15 muestras al azar de casos confirmados de dengue incluyendo a ambos grupos comunitario y hospitalario.

4.6.2.4 FASE IV:

- **Entrega de Resultados:** Los resultados de las muestras fueron entregados a los integrantes del grupo de tesis, por la encargada del departamento de serología y virología del Laboratorio Nacional de Salud, quedando pendientes 15 muestras que por criterios internos del Laboratorio de Salud no fueron procesadas. Los resultados obtenidos fueron enviados por vía electrónica al departamento del Epidemiología del Hospital Regional de Zacapa y al Centro de Salud de Gualán.

4.7 Procesamiento y análisis de datos

A los pacientes referidos con sospecha clínica de dengue, se les interrogó para verificar si coincidían con la definición de "caso sospechoso" de dengue de la OPS; a continuación si el caso referido coincidía con la definición por evaluación clínica, previa firma del consentimiento informado, se obtuvo una muestra de sangre venosa de 8 a 10 centímetros cúbicos para adultos y de 2 a 4 centímetros cúbicos para niños. Posteriormente las muestras fueron transportadas al Laboratorio Nacional de Salud en donde fueron procesadas, con todas las normas de calidad y bioseguridad establecidas (11). Si el paciente evaluado se encontraba cursando en los primeros 3

días de sintomatología clínica se realizó PCR y si el paciente presentaba más de 4 días de sintomatología se le realizó diagnóstico por medio de IgM anti-dengue (ELISA). Luego de obtenidos los resultados del trabajo de campo, se ingresaron en una hoja electrónica en el programa EXCEL y posteriormente fueron procesados y analizados por medio de Epi-info versión 3.5.1.

4.8 Alcances y límites de la Investigación

Los alcances del presente estudio fueron el diagnóstico de dengue y la identificación de serotipos virales por medio de serología y PCR en tiempo real y su relación con la severidad de los casos, además de la relación entre infección previa y dengue hemorrágico. Las principales limitantes del estudio fueron falta de capacitación del personal de salud tanto en Gualán como en el Hospital Regional de Zacapa para la identificación de "caso sospechoso de dengue"; la dispersión de los habitantes del municipio de Gualán, en albergues debida a que la toma de muestras por razones ajenas, coincidieron con el desastre natural ocasionado por la tormenta tropical Agatha, así como las 15 muestras no procesadas por el Laboratorio Nacional de Salud, que impidieron obtener los resultados de todos los sueros obtenidos.

4.9 Aspectos éticos:

Se informó y solicitó el permiso a las autoridades correspondientes, se informó a la población a través de medios de comunicación sobre el lugar donde se llevó a cabo el procedimiento para la toma de muestra, explicando detalladamente la técnica para la extracción, manejo y transporte de la misma. Se solicitó consentimiento informado a cada uno de los pacientes seleccionados para el estudio (ver anexo II).
Se respetaron los derechos del autor con las bibliografías utilizadas y la identidad, integridad física y emocional de la población de la muestra.

4.9.1 Categoría del estudio

Este estudio corresponde a la categoría de Riesgo II (26).

5. RESULTADOS

5.1 Tabla 1

Distribución epidemiológica y clínica de 131 casos sospechosos y diagnosticados de dengue en el Centro de Salud de Gualán, búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010

		f	%
Sexo	Masculino	71	54.2
	Femenino	60	45.8
	Total	131	100
Edad	0 – 9	24	18.32
	10 – 19	42	32.06
	20 – 29	21	16.03
	30 – 39	20	15.26
	40 – 49	4	3.05
	50 – 59	9	6.87
	60 – 69	8	6.10
	Mayor de 70	3	2.29
Clasificación de Dengue según clínica	Clásico	116	88.5
	Hemorrágico	15	11.5
Serotipo	DEN – 1	3	23
	DEN – 2	10	77
Casos Sospechosos	Comunidad	71	54
	Hospital	60	46
	Total	131	100
Casos Confirmados	Comunidad	18	47.4
	Hospital	20	52.6
	Total	38	100
Métodos Diagnósticos	IgM Procesadas	109	100
	Positivas	30	27.6
	Negativas	79	72.4
	PCR Procesadas	13	100
	Comunidad	12	92.3
	Hospital	1	7.7
	NS1 Procesadas	15	100
	Positivas	4	26.6
	Negativas	11	73.3
Promedio días con síntomas		4.85	
Severidad Clínicamente evaluada	Leve	41	100
	Comunidad	2	4.9
	Hospital	39	95.1
	Moderado	81	100
	Comunidad	29	35.8
	Hospital	52	64.1
	Severo	8	100
	Comunidad	2	25
	Hospital	6	75
	Complicados	1	100
	Comunidad	1	100
	Hospital	0	0

Fuente: Instrumento de recolección de datos

5.2 Tabla 2

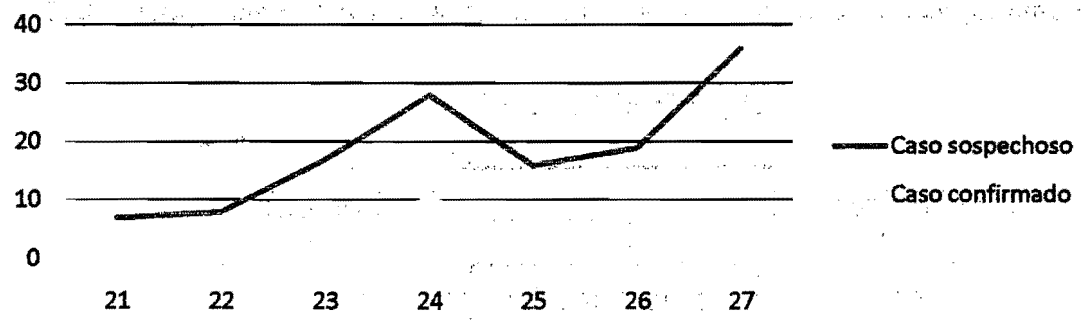
Datos generales y epidemiológicos comparativos de los 131 casos sospechosos y diagnosticados de dengue en el Centro de Salud de Gualán, búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010

		Comunidad		Hospital	
		f	%	*f*	%
Sexo	Masculino	32	45.07	39	65
	Femenino	39	54.92	21	35
	Total	71	54.19	60	45.81
Edad	0 – 9	7	9.90	17	28.3
	10 – 19	25	35.20	16	26.6
	20 – 29	10	14.00	12	20
	30 – 39	14	19.70	6	10
	40 – 49	4	5.60	0	0
	50 – 59	5	7.04	4	6.7
	60 – 69	5	7.04	3	5
	Mayor de 70	1	1.43	2	3.4
Tipo de Dengue según clínica	Clásico	69	97.2	47	78.3
	Hemorrágico	2	2.8	13	21.7
Serotipo	DEN – 1	3	25	0	0
	DEN – 2	9	75	1	100
	Total	12	100	1	100
Métodos Diagnósticos	IgM procesadas	50	70.4	59	98.3
	Positivas	10	20	20	33.90
	Negativas	40	80	39	66.10
	PCR procesadas	12	100	59	100
	Positivas	12	100	1	1.69
	Negativas	0	0	58	98.31
	NS1 procesadas	13	100	2	100
	Positivas	4	30.8	0	0
	Negativas	9	69.2	2	100
Promedio días con síntomas		4.56		5.21	

Fuente: Instrumento de recolección de datos

5.3 Gráfica 1

Frecuencia de casos sospechosos y casos confirmados dengue en el Centro de Salud de Gualán, búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010



Fuente: Instrumento de recolección de datos

5.4 Tabla 3

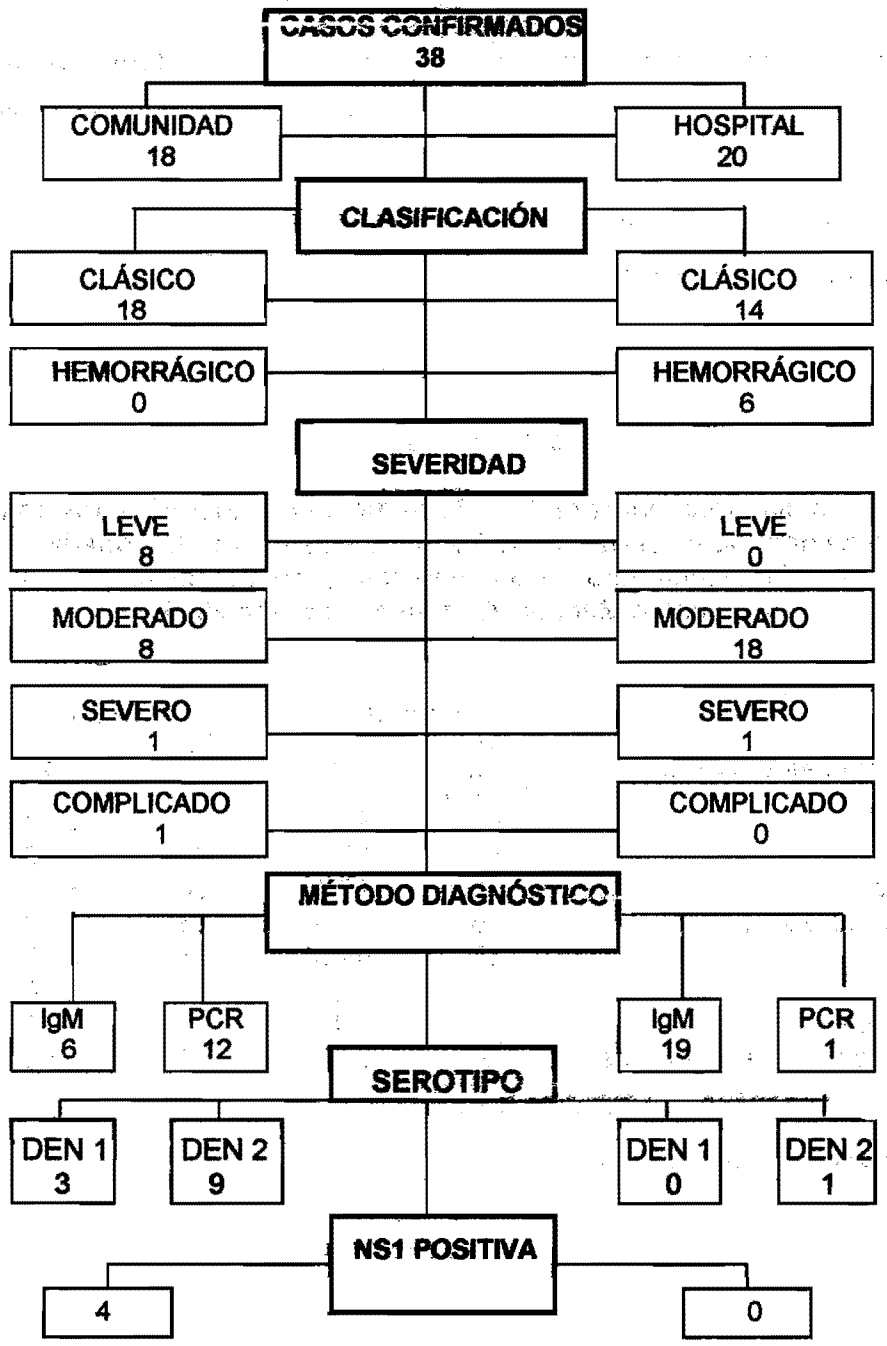
Síntomas y signos más frecuentes en los 131 participantes identificados como caso sospechoso de dengue en el Centro de Salud de Gualán, por búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010

	Comunidad		Hospital	
Síntomas y Signos	**F (n=71)**	**%**	**F (n=60)**	**%**
Cefalea	65	91.5	49	81.7
Mialgias	64	90.1	45	75.0
Artralgias	55	77.4	50	83.3
Dolor Retroorbitario	56	78.8	36	60.0
Fiebre	67	94.3	55	91.7
Rash	6	8.50	15	25.0
Rumpel Leed	1	1.40	1	1.70
Manifestaciones hemorrágicas	2	2.80	15	25.0

Fuente: Instrumento de recolección de datos

5.5 Diagrama 1

Origen, clasificación, severidad, método diagnóstico, serotipo y presencia de proteína NS1 de los 38 casos confirmados de dengue en el Centro de Salud de Gualán, búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010



Fuente: Instrumento de recolección de datos.

5.5 TABLA 4

Clasificación del dengue en pacientes con diagnóstico conformado por PCR tiempo real y/o IgM en el Centro de Salud de Gualán, por búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa durante las semanas epidemiológicas 21 a 27, mayo-julio, Gualán, Zacapa, Guatemala, agosto 2010

Clasificación	IgM	PCR	IgM y PCR*
Clásico	24	8	5
Hemorrágico	6	0	0

Fuente: Instrumento de recolección de datos

6. DISCUSIÓN

De los 131 de casos sospechosos identificados, se confirmó el diagnóstico de dengue en 38, lo que equivale al 29%, estos fueron confirmados por medio de IgM anti dengue por método de ELISA y/o por Reacción en Cadena de la Polimerasa; de ellos 18 fueron detectados en la comunidad y 20 en el Hospital Regional de Zacapa. El intervalo de edad más afectado en la comunidad fue de 10 a 19 años y en el hospital de 0 a 9 años de edad. Estos datos indican que es la población de edad escolar y de adolescencia la más afectada por la infección del virus dengue y que los casos hospitalarios se presentaron en personas aun más jóvenes lo que concuerda con estudios previos que evidencian que debido a factores inmunológicos, son los menores de 15 años de edad los más afectados por este padecimiento (17).

Los serotipos virales identificados en este estudio fueron DEN-1 y DEN-2; el serotipo DEN-2 también fue aislado en la epidemia del año 2009; en el año 2008 se aisló DEN-2 y DEN-4, según los datos reportados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2,11), lo que significa que en el departamento de Zacapa circulan 3 de los 4 serotipos del virus del dengue. En el presente estudio el serotipo DEN-2 fue el predominante, encontrándose en 10 de los 13 casos en los que se logró determinar serotipo, representando el 76% de los casos. El serotipo DEN-1 únicamente se presentó en el 24% de los casos, todos provenientes de la comunidad. Según los resultados del presente estudio, el serotipo DEN-2 es el que se encuentra relacionado con aparición de manifestaciones hemorrágicas, tal como lo exponen estudios previos que han demostrado relación entre éste y manifestaciones hemorrágicas independientemente si es o no primo infección (11). El aislamiento de DEN-1 es importante ya que la presencia de un serotipo distinto al del año anterior puede provocar casos hemorrágicos y severos debido a que la reinfección y la circulación de los cuatro serotipos en un mismo lugar son considerados factores de riesgo para la fiebre hemorrágica del dengue (7).

La IgM anti dengue por método de ELISA utilizado por el Laboratorio Nacional de Salud para el presente estudio, tiene sensibilidad del 98% y una especificidad de 99%, esta se corrió en 50 muestras provenientes de la comunidad de las cuales 10 fueron positivas y en 59 muestras provenientes del Hospital, de esas 20 fueron positivas (Tabla I, II, III). Lo anterior puede deberse a varias situaciones, una de ellas es que los títulos de IgM se empiezan a elevar en la fase aguda de la enfermedad aproximadamente a los 5 días del

inicio de síntomas, sin embargo, los títulos de anticuerpos IgM, alcanzan su mayor nivel entre los 15 y los 20 días del inicio de la enfermedad, los pacientes estudiados tenían en promedio 6 días de sintomatología (Tabla II) lo que explicaría por qué la mayor parte de los pacientes obtuvieron resultados negativos. También cabe destacar que cuando se ha padecido de una infección previa, los títulos de IgM para dengue pueden elevarse muy poco, siendo indetectables para las pruebas estándar utilizadas. Cabe resaltar que solamente 6 de estos 30 casos confirmados, refirieron haber presentado una infección previa por el virus dengue, 5 de ellos provenían de la comunidad y 1 del hospital.

Los serotipos encontrados por PCR, fueron DEN1 Y DEN 2, logrando identificarse en 13 casos, esto a pesar de que el promedio de los días con síntomas en los que se captaron fue de 4.56 días, lo que significa que la mayoría de muestras se encontraron dentro del período tardío para cultivo viral (siendo el tiempo ideal para esta prueba de 0 a 3 días), sin embargo en el presente estudio, se identificó el serotipo con un promedio de 4.56 días, debido a que la PCR en tiempo real es una metodología altamente sensible; según estos datos, al no utilizar un método altamente sensible como la PCR en tiempo real, debe acortarse el periodo de tomas de muestra a 3 días o menos, teniendo en cuenta que el período de viremia se prolonga hasta las 72 horas del inicio de la sintomatología, transcurrido este tiempo, el efecto citopático provocado por el sistema inmunológico del huésped impide su detección (7).

En lo que respecta a los resultados obtenidos en el Hospital, 17 de los 60 casos sospechosos identificados, presentaban pruebas positivas de inmunocromatografía por placas para detección anticuerpos IgM anti dengue, utilizada intrahospitalariamente para diagnóstico de dengue. De todas las muestras enviadas al Laboratorio Nacional de Salud, solamente 20 fueron confirmadas por IgM y/o PCR, lo que podría explicarse por el número de días con síntomas que los pacientes poseían, sin embargo quedará para estudios posteriores, determinar la calidad, sensibilidad y especificidad de la prueba rápida utilizada en el Hospital, para determinar si realmente estos casos son positivos, pues ninguno de los 17 participantes con inmnunocromatografía por placas positiva fue positivo en las pruebas utilizadas en el Laboratorio Nacional de Salud para este estudio; Lo anteriormente descrito cobra importancia para la Salud Pública ya que los métodos estándar utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, deben ser confiables, de rápido diagnóstico y no deben representar una carga económica elevada.

La proteína NS1 en el presente estudio inicialmente fue planteada para determinación en casos de dengue severo confirmado y en pacientes hospitalizados, sin embargo por criterios internos del Laboratorio Nacional de Salud, solamente se determinó en 15 muestras tomadas al azar de los 38 participantes con diagnóstico confirmado de dengue, de ellas solamente 4 fueron positivas. Estas pruebas positivas se presentaron en casos de dengue leve y moderado que provenían de la comunidad, ninguna fue detectada en casos hemorrágicos ni en casos severos. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, la proteína de liberación NS1 no se expresa solamente en casos complicados, sino también aparece en casos moderados y leves, al contrario de lo que exponen estudios previos que refieren que la proteína de liberación NS1 se expresa en la superficie de las células infectadas por el virus en casos severos de dengue (7). Los datos anteriores evidencian que no se han realizado suficientes estudios acerca de esta proteína y la importancia de utilizar métodos diagnósticos precisos para el pronóstico de esta enfermedad, que podrían predecir la evolución de la misma.

7. CONCLUSIONES

7.1 Durante las semanas epidemiológicas 21 a 27 del año 2010 se identificaron 131 casos sospechosos de dengue. En la comunidad se captaron 71 casos durante este período en comparación con el año 2009 en el que se reportaron únicamente 3 casos sospechosos durante el mismo período. En el Hospital Regional de Zacapa, se identificaron 60 casos sospechosos de dengue, de ellos se confirmaron 20 en comparación con el año anterior en el que se confirmaron, en estas semanas epidemiológicas 3 casos de dengue clásico y 1 caso de dengue hemorrágico.

7.2 Se diagnosticaron 38 casos de dengue por medio de IgM anti dengue y PCR en tiempo real, se determinaron DEN-1 y DEN-2 como los serotipos virales circulantes en el Centro de Salud de Gualán, por búsqueda activa y Hospital Regional de Zacapa, hallazgo importante porque significa la existencia de factores de riesgo para fiebre hemorrágica de dengue en casos futuros.

7.3 La población en edad escolar y adolescencia fue la más afectada lo que confirma que las personas más jóvenes son las que tienen mayor probabilidad de sufrir la infección por el virus del dengue debido a factores inmunológicos.

7.4 El serotipo viral DEN-2 identificado, presentó mayores manifestaciones clínicas, en relación a las presentadas por el serotipo viral DEN -1.

7.5 Los serotipos virales circulantes identificados en la comunidad fueron DEN-1 y DEN-2, en el Hospital Regional de Zacapa se identificó únicamente DEN-2, lo que confirma la relación del serotipo DEN-2 con la severidad de la enfermedad y que los casos más graves acuden al Hospital.

7.6 No se pudo comprobar la presencia de la proteína de liberación NS1 en casos severos de dengue, pero se comprobó que esta proteína también se expresa en casos leves y moderados.

8 RECOMENDACIONES

8.1 Implementar la capacitación constante del personal de salud para la detección sistemática de los casos sospechosos de dengue en la comunidad y en el Hospital aplicando los criterios propuestos por la OPS para caso sospecho.

8.2 Capacitar al personal de salud para el manejo clínico del dengue tanto en la comunidad como en el Hospital para disminuir la mortalidad por dengue.

8.3 Desarrollar programas como la Comunicación para impactar la conducta en dengue (COMBI), que tengan como objeto disminuir la incidencia de casos de dengue en niños y adolescentes a través de la educación en salud en conjunto con la participación comunitaria.

8.4 Fortalecer la vigilancia epidemiológica del dengue con el objeto de prevenir infecciones futuras con diferente serotipo viral, identificando las áreas geográficas en las cuáles circulan los mismos.

8.5 Implementar métodos diagnósticos distintos de la proteína de liberación NS1, que permitan el pronóstico de casos severos, ya que en el presente estudio la presencia de esta proteína se detectó únicamente en casos moderados y leves.

9 APORTES

9.1 El presente estudio permitió identificar los serotipos circulantes del virus del dengue además de comparar el comportamiento de la enfermedad en la comunidad y en el hospital.

9.2 Este estudio aportó información importante sobre aspectos que anteriormente no se habían estudiado en Guatemala, ya que relacionó serotipos y manifestaciones clínicas.

9.3 Los serotipos de virus dengue fueron identificados por medio PCR tiempo real, siendo este el primer estudio en Guatemala en el cual se empleó esta técnica.

9.4 El estudio permitió identificar la presencia de proteína NS1 en casos leves y moderados de dengue.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marquetti MdelC, Suarez S, Bisset J. Reporte de hábitats utilizados por Aedes aegypti en Ciudad de la Habana Cuba. Rev Cub Med Trop 2005; 57 (2): 159-61.

2. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Boletín Epidemiológico, semana 52. 27 de diciembre de 2009 al 2 de enero de 2010; [monografía en línea] Guatemala: MSPAS 2,010 Disponible en http://epidemiologia.mspas.gob.gt.

3. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Sistema de Información Gerencial en Salud (SIGSA). Casos de dengue departamento de Zacapa de Enero a Diciembre. Guatemala: MSPAS, 2009.

4. Hospital Regional de Zacapa. Corredor endémico: semanas epidemiológicas 1-12: Guatemala: El Hospital, 2009.

5. Méndez JA, Bernal MdelP, Calvache D, Boshell J. Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus dengue tipo II. Nova/publicación científica vol I enero-diciembre de 2003.

6. Alvarado Illescas W J. Seroprevalencia de Anticuerpos IgG Antivirus Dengue en el departamento del Progreso. [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Medicas, 2009.

7. Umesh C Ch, Rachna N, Richa Sh. Dengue and dengue heamorrhagic fever: implications of host and genetics, Department of Microbiology, K.G. Medical University, Lucknow, India. 2006. [monografía en línea] disponible en: medicina.usac.edu.gt/dengue/inmunologia_de_dengue_hemorragico.pdf. 2000 [accesado 15 de abril de 2010.

8. Rigau-Perez J. The early use of break-bone fever (Quebrantahuesos 1771), and Dengue (1801) in Spanish. Amer Jour Trop Med Hyg.1998 August 59 (2): 272.

9. Organización Panamericana de la Salud. Resurgimiento de dengue en las Américas. Boletín Epidemiológico Jul 1997; 18 (2) 1-12.

10. Ocazionez RE, Gómez S, Cortés FM. Serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica Colombiana. Rev Salud Pública.2007; 9 (2):262-274.

11. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. Centro de investigaciones de Ciencias de la Salud. MSPAS. División de Malaria. Caracterización epidemiológica del dengue en áreas endémicas de Guatemala. Guatemala: CICS, 1994.

12. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Boletín Epidemiológico 1998; 19 (2): 9-13.

13. Medina Duque JP. Eficacia de las campañas de erradicación del vector Aedes Aegypti para el control de la enfermedad del dengue. 2002.

14. Salvatella Agrelo R. Sindicato médico de Uruguay. Aedes aegypti albopictus (diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas._[monografía en línea] 1,996 [accesado 14 de abril de 2010] Disponible en: http://www.cepis.org.pe/bvsair/e.

15. Cruz A, Rolland L. El virus del dengue, diagnóstico.[monografía en línea] Peru: 2,002 [accesado 19 de marzo 2010] Disponible en http://www.fihu-diagnóstico.org.pe/revista/numeros/2002/julago02/165-172.htlm

16. Gordillo B. Evaluación del sistema de vigilancia epidemiológica del dengue/dengue hemorrágico del departamento de Zacapa En: Boletín Epidemiológico (Guatemala) 21:9.

17. Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. Biología y diagnóstico del dengue; laboratorio de anticuerpos monoclonales y síntesis de péptidos, Centro de Inmunoensayo.Rev Biomed (La Habana Cuba) 2005; 16:113-137.

18. Falkonar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein NSI. J Virol Methods 1990; 30:323-32.

19. Dengue en Centro América: las epidemias del 2000 [en línea] [accesado 13 de mayo 2010] Disponible en: http://www.paho.org/spanish/sha/be_v21n4-dengue.htm

20. Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiologia. Guía para el equipo de salud No. 2.[en linea] Argentina: MSAL . [accesado 13 de mayo 2010] . Disponible en: www.msal.gov.ar

21. Martínez Torrez E. Dengue. Estud. AV [revista en línea] Dec 2008 [accesado mayo 2010] 22 (64): [5 pantallas] [en línea] [accesado: mayo 2010]. Disponible en: http//www.scielo.br/cielo.org

22. Poletto Jiménez V. Evaluación Comparativa del paciente con fiebre dengue aplicando la clasificación de la OMS y el índice de severidad del estado clínico. Hospital Pediátrico "Dr. Agustín Zubillaga", Barquisimeto. Estado Lara. Abril 2001-septiembre 2002 [en línea] 2003 [tesis de Médico y Cirujano]. Venezuela: Universidad Centroocidental "Lisandro Alvarado" Decanato de Medicina [accesado mayo de 2010]. Disponible en http://bibmed.ucla.edu.ve.

23. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas. Dengue: aspectos clínicos y de salud pública. Atlanta: CDC [en línea] [accesado 11 de abril 2010] Disponible en http:/ /www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/ set1/i/slide08.htm.

24. Gary G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Northem Mexico and South Texas. Rev. Amer Jour Trop Med Hyg. [revista en linea] 2008 [accesado 13 de mayo 2010] 78(3):361-362. Disponible en: http://www.cenave.gob.mx/dengue.

25. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 4 ed. España: Elsevier, 2004.

26. García CO, de León B ER, López S VA, De la Roca M LG, Puac P VD, Ramírez F DE. Guía para elaboración de protocolo de investigación. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. CICS. 2010.

11. ANEXOS

ANEXO I

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

Fecha: Boleta No.:

Nombre: _____ Edad: _____ Sexo: _____
Tipo de caso:
Hospitalario ☐
Comunitario ☐

Fecha de inicio de síntomas: _____ número de días con síntomas: _____

Dirección y procedencia: _____

Otro miembro de la familia con síntomas en este momento: sí __ no __

Usted ha tenido dengue sí__ no__ cuantas veces: _____

Quién le hizo el diagnóstico: _____

Tuvo manifestaciones hemorrágicas en esa ocasión: sí __ no __

Caso sospechoso de dengue: paciente con enfermedad febril aguda de 2 a 7 días de duración máxima y con 2 o más de los siguientes síntomas o signos.

Cefalea: ☐ Dolor retroorbitario: ☐ Mialgias: ☐

Artralgias: ☐ Fiebre: ☐ Erupción Cutánea: ☐

Prueba de Rumpel Lid: Positiva: ☐ Negativa ☐

Manifestaciones hemorrágicas: Sí: ☐ No: ☐

Clasificación: Clásico ☐ Hemorrágico ☐

Según severidad: Leve ☐ Moderado ☐ Severo ☐ Complicado ☐

PCR: Sí__ No__ Serotipo: __

IgM: Positivo__ Negativo__

NS1: Sí__ No__ No. de muestras positivas:

Observaciones:

_____

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Pacientes con Caso Sospechoso de Dengue en Gualán Zacapa

Se invita a participar en este estudio a todas las personas que sean clasificadas como caso sospechoso de dengue, de cualquier sexo y edad; que habiten en el municipio de Gualán Zacapa.

Por este medio nos permitimos presentarnos como estudiantes del último año de la carrera de Médico y Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Nos encontramos realizando el trabajo de tesis sobre el dengue, una enfermedad que se caracteriza por fiebre, dolor en articulaciones y músculos, que afecta a personas de toda edad y sexo. Ésta enfermedad puede cursar con síntomas sin importancia o bien puede poner en peligro la vida del paciente. A continuación le invitamos a participar en nuestro estudio por lo que le proporcionamos información con respecto al tema. Antes de decidirse puede hablar sobre la investigación con alguien con quien se sienta cómodo. Siéntase en la libertad de interrumpirnos mientras le informamos sobre el tema para manifestarnos sus dudas según lo crea conveniente.

El dengue, por lo general es diagnosticado por médicos basándose en el cuadro clínico del paciente, sin embargo los síntomas de dengue pueden confundirse frecuentemente con enfermedades respiratorias entre otras. Por lo anteriormente expuesto, es importante el diagnostico de dengue mediante exámenes realizados en sangre debido a que estos son específicos. Por otro lado se realizara serotipificación para saber a qué clase pertenece el virus, esto es importante debido a que dependiendo de la clase de virus dengue encontrado en un paciente se relaciona con la gravedad y pronostico de la enfermedad.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, sin ningún costo ni remuneración; usted puede elegir participar o no. Tanto si elige participar como si no, continuaran todos los servicios que recibe en esta institución y nada variará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Una vez que usted acepte participar en el estudio se procederá a:

- Extraer una muestra de sangre mediante punción venosa para lo que se utilizara material completamente descartable y desinfectado. Esta extracción constara de aproximadamente de 8 a 10 centímetros cúbicos lo que (corresponde a dos cucharada de café); dicha extracción será levemente dolorosa como un piquete de hormiga, la cual podría provocar una mancha violácea.

- La muestra será trasladada al Laboratorio Nacional de Salud, donde se procesaran las muestras, dicho laboratorio es el laboratorio de referencia nacional que maneja los más altos estándares de calidad y procesada por personal altamente calificado.

- Los resultados de las muestras serán entregados a usted o a su médico tratante en el mismo lugar donde se le extrajo la muestra, dichos resultados serán confidenciales.

He sido invitado (a) a participar en la investigación titulada: "Diagnóstico de casos de dengue utilizando IgM anti-dengue y serotipificación viral." Entiendo que se me extraerán de 8 a 10 mililitros de sangre en una sola oportunidad o en más de una de ser necesario. He sido informado que los riesgos son mínimos y que pueden incluir un leve dolor en el sitio de de la punción. Sé que existen beneficios para mi persona si resultan mis pruebas positivas ya que he sido informada que al tener una infección por dengue la segunda podría ser más grave y que debo tomar medidas en mi hogar para prevenir una segunda infección. Se me ha proporcionado los nombres y dirección de los investigadores para que puedan ser fácilmente contactados.

Nombre del participante_____

Firma del participante_____

Si es analfabeto

Nombre del testigo_____

Huella dactilar del participante_____

Firma del testigo_____

Fecha_____

Nombre, correo electrónico y teléfono de los investigadores:

Lorena Maricel Alay Chinchilla	46074352	lorenlay82@hotmail.com
Didier Geovanny Cuc Güitz	57791957	cdidiergeovanny@gmail.com
Yuri Melina Velásquez Fong	53868113	melinavf@hotmail.com
Aura Elizabeth López Guillermo	41330238	abby.lopezguillermo@gmail.com
Jorge Rolando Fajardo Moreno	41066353	sugilacion@gmail.com

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Pacientes con caso confirmado de dengue hospitalizados
En el Hospital Regional de Zacapa.

Se invita a participar en este estudio a todas las personas que sean clasificadas como caso confirmado de dengue, de cualquier sexo y edad; que se encuentren hospitalizados en el Hospital Regional de Zacapa.

Por este medio nos permitimos presentarnos como estudiantes del último año de la carrera de Médico y Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Nos encontramos realizando el trabajo de tesis sobre el dengue, una enfermedad que se caracteriza por fiebre, dolor en articulaciones y músculos, que afecta a personas de toda edad y sexo. Ésta enfermedad puede cursar con síntomas sin importancia o bien puede poner en peligro la vida del paciente. A continuación le invitamos a participar en nuestro estudio por lo que le proporcionamos información con respecto al tema. Antes de decidirse puede hablar sobre la investigación con alguien con quien se sienta cómodo. Siéntase en la libertad de interrumpirnos mientras le informamos sobre el tema para manifestarnos sus dudas según lo crea conveniente.

El dengue, por lo general es diagnosticada por médicos basándose en el cuadro clínico del pacientes, sin embargo los síntomas de dengue pueden confundirse frecuentemente con enfermedades respiratorias entre otras. Por lo anteriormente expuesto, es importante el diagnostico de dengue mediante exámenes realizados en sangre debido a que estos son específicos. Por otro lado se realizara detección de proteína de liberación NS1 que es un resultado que permite predecir la gravedad y pronóstico de la enfermedad.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, sin ningún costo ni remuneración; usted puede elegir participar o no. Tanto si elige participar como si no, continuaran todos los servicios que recibe en esta institución y nada variará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Una vez que usted acepte participar en el estudio se procederá a:

- Extraer una muestra de sangre mediante punción venosa para lo que se utilizara material completamente descartable y desinfectado. Esta extracción constara de aproximadamente de 8 a 10 centímetros cúbicos lo que (corresponde a dos cucharada de café); dicha extracción será levemente dolorosa como un piquete de hormiga, la cual podría provocar una mancha violácea.

- La muestra será trasladada al Laboratorio Nacional de Salud, donde se procesaran las muestras, dicho laboratorio es el laboratorio de referencia nacional que maneja los más altos estándares de calidad y procesada por personal altamente calificado.

- Los resultados de las muestras serán entregados a usted o a su médico tratante en el mismo lugar donde se le extrajo la muestra, dichos resultados serán confidenciales.

He sido invitado (a) a participar en la investigación titulada: "Diagnóstico de casos de dengue utilizando IgM anti-dengue y serotipificación viral." Entiendo que se me extraerán de 8 a 10 mililitros de sangre en una sola oportunidad o en más de una de ser necesario. He sido informado que los riesgos son mínimos y que pueden incluir un leve dolor en el sitio de de la punción. Sé que existen beneficios para mi persona si resultan mis pruebas positivas ya que he sido informada que al tener una infección por dengue la segunda podría ser más grave y que debo tomar medidas en mi hogar para prevenir una segunda infección. Se me ha proporcionado los nombres y dirección de los investigadores para que puedan ser fácilmente contactados.

Nombre del participante_____

Firma del participante_____

Si es analfabeto

Nombre del testigo_____

Huella dactilar del participante_____

Firma del testigo_____

Fecha_____

Nombre, correo electrónico y teléfono de los investigadores:

Lorena Maricel Alay Chinchilla	46074352	lorenlay82@hotmail.com
Didier Geovanny Cuc Güitz	57791957	cdidiergeovanny@gmail.com
Yuri Melina Velásquez Fong	53868113	melinavf@hotmail.com
Aura Elizabeth López Guillermo	41330238	abby.lopezguillermo@gmail.com
Jorge Rolando Fajardo Moreno	41066353	sugilacion@gmail.com