

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE C. C. Q. Q. Y FARMACIA



INFORME DE TESIS

Presentado por

KLELIA XIOMARA DOMINGUEZ GUERRERO

Para optar al título de

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, febrero de 2000.-

DL
06
T(2042)

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE C.C.Q.Q. Y FARMACIA

DECANA: Licda. HADA MARIETA ALVARADO BETETA

SECRETARIO: Lic. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I: Dr. OSCAR MANUEL COBAR PINTO

VOCAL II: Dr. RUBEN DARIEL VELAZQUEZ MIRANDA

VOCAL III: Lic. RODRIGO HERRERA SAN JOSE

VOCAL IV: Br. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ

VOCAL V: Br. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Fuente inagotable de sabiduría que me permitió culminar uno de mis mas grandes ideales.

AL ANGEL DE ARGELIA BARATTO: Por que hoy ve florecer su semilla y será siempre la luz que guía mi camino.

A GUATEMALA: Por un mañana mejor.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y
A LA FACULTAD DE C.C.Q.Q. Y FARMACIA: Templo donde se hizo realidad mi ideal.

A MIS PADRES: Con amor y agradecimiento, que mi triunfo sea un mínimo fruto de sus múltiples sacrificios.

A MI HERMANA: Claudette, por su apoyo y cariño.

A MI ABUELO: Rogelio Juárez, mi sincero agradecimiento por sus sabios
Consejos, ayuda y cariño, rogando al Divino Creador bendiciones sobre él.

A MIS TIOS: Rodolfo, Javier y Tére, con amor fraterno.

A MIS AMIGOS: Rosita, Karen, Javier, Carmen Rosa y Ana Myriam por su amistad y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A LA LICDA. OLGA TORRES: Por su amistad y excelente asesoría brindada en este trabajo de tesis.

A ESPERANZA DE BRAM: Por su valiosa colaboración y ayuda constante e incondicional.

A LOS PROFESIONALES Y PERSONAL TECNICO DEL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (INCAP): Por toda la colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron con la realización de este estudio.

INDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA (S)</u>
1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
3.- Antecedentes	
3.1 Definición	4
3.2 Epidemiología	5
3.3 Transmisión	9
3.4 Características del vector	10
3.5 Tratamiento específico	12
3.6 Respuesta inmunológica	13
4.- Métodos diagnósticos	
4.1 Diagnóstico serológico	14
4.2 Aislamiento del virus	19
5.- Justificación	24
6.- Objetivos	
6.1 General	25
6.2 Específicos	25
7.- Hipótesis	26
8.- Materiales y métodos	
8.1 Universo de trabajo	27
8.2 Recursos	27
8.3 Procedimiento	27
9.- Resultados	37
10.- Discusión	40
11.- Conclusiones	44
12.- Recomendaciones	45
13.- Bibliografía	46
14.- Anexos	53

1.- RESUMEN

El dengue es una enfermedad aguda y generalizada propia de regiones trópicas y subtrópicas, ocasionada por el virus del Dengue o denguevirus. En nuestro país el diagnóstico de dengue ha sido un problema, debido en primer lugar a que el dengue presenta un cuadro febril que puede confundirse con otras patologías y en segundo lugar porque no existen pruebas de laboratorio rápidas, sensibles, específicas y de bajo costo disponibles en el mercado. En este estudio se preparó antígeno viral (D1, D2, D3, D4) a partir de cultivo de células C6/36 y VERO, desarrollando la capacidad de realizarlo por medio de citocultivadores manuales y colocándolo en tiras de papel prefiltro en donde se evaluó el antígeno realizado, comparando su eficacia con el método comercial de Dengue -S- stick con el cual se obtuvo 0.55 de concordancia lo que equivale a una buena relación o acuerdo intermedio aceptable entre ambas pruebas. Se obtuvieron 10 % de falsos positivos y un 12.5 % de falsos negativos debido a que interfiere la fase de la enfermedad que presentaba el paciente.

El antígeno preparado se utilizará para montar la prueba de EIA en un posterior estudio.

2.-INTRODUCCION

Las técnicas serológicas constituyen un auxiliar imprescindible en el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil y tardado que resulta en la mayoría de los casos, lograr el diagnóstico por aislamiento viral. Para el diagnóstico del virus de la familia Flaviridae se han aplicado pruebas serológicas que por su amplio uso se consideran como técnicas clásicas, tal es el caso de la inhibición de la hemaglutinación (IH), fijación del complemento (FC) y la neutralización (NT) (1). Cada una de ellas detecta anticuerpos de diferentes clases y sus resultados tienen distinto significado para el diagnóstico; al comparar diversas técnicas de detección de anticuerpos, cada una de ellas es capaz de detectar tipos diferentes, por lo que sólo en aquellos casos donde ambas pruebas miden los niveles de anticuerpos semejantes puede establecerse una correlación estrecha entre sus resultados (1).

En años recientes se han introducido técnicas de mayor sensibilidad y facilidad de ejecución, que han ido ganando terreno en el campo del diagnóstico en virología, sobre todo por lograr resultados rápidos.

Entre ellas se encuentran el radioinmunoensayo, la inmunofluorescencia, la inmunomicroscopía electrónica y

los ensayos inmunoenzimáticos (1). Dentro de estos últimos el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (EIA) ha alcanzado una gran utilidad en el diagnóstico de la hepatitis, rubeola, etc. Por las implicaciones de riesgo del Dengue Hemorrágico es importante conocer los serotipos que están circulando durante un brote epidémico y si este serotipo ha causado epidemias anteriores. Con los métodos de laboratorio convencionales como la inhibición a la hemaglutinación (IH) no se establecen dichos serotipos y solo el cultivo viral en células de mosquito seguido de inmunofluorescencia (IF) o el RT-PCR permiten diferenciar el serotipo viral. Sin embargo, esto requiere infraestructura no disponible para todos en nuestro país.

Se han desarrollado pruebas comerciales cuyo costo, desafortunadamente es muy elevado para ser usado de rutina en el sector público, en este estudio se busca una alternativa de bajo costo a estas pruebas. Se pretende la producción local de antígeno de dengue por medio de citocultivadores manuales, para colocarlo posteriormente en tiras reactivas de papel pre-filtro y comparar los resultados obtenidos con el método comercial Dengue-S-sticks, para ser aplicado en técnicas de diagnóstico sencillas y de bajo costo, como el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida.

3.-ANTECEDENTES

3.1 DEFINICION

El dengue es una enfermedad aguda y generalizada, propia de regiones trópicas y subtrópicas. Es producida por un virus de la familia Flaviviridae y es transmitida por el mosquito hematófago *Aedes aegypti* (2). La infección es causada por los cuatro serotipos del virus que son antígenicamente diferentes y se designan D-1, D-2, D-3 y D-4.

La primera vez que se demostró la capacidad de *A. albopictus* para transmitir virus del dengue fue en 1926, en estudios con seres humanos voluntarios (3). Hay dos manifestaciones clínicas del dengue: una es la fiebre del dengue que se caracteriza clínicamente por un cuadro febril con patrón difásico, cefalea, dolores en diferentes partes del cuerpo, postración, exantema, linfadenopatía y leucopenia (4). Se cree que aproximadamente el 50% de los pacientes son asintomáticos. Los cuadros clásicos y atípicos no suelen presentar complicaciones y su mortalidad es muy baja (5). La segunda manifestación del dengue es la fiebre hemorrágica que es severa, caracterizada por anormalidad en la hemostasia y aumento en la permeabilidad vascular, que en algunos casos puede conducir a choque hipovolémico (4),

por lo que se le ha designado según la OMS cuatro diferentes grados de dengue hemorrágico de acuerdo con la severidad de la enfermedad (Ver Anexos 1 y 2).

El diagnóstico diferencial se hace con leptospirosis, fiebres hemorrágicas, paludismo, fiebre tifoidea, brucelosis, pielonefritis, sarampión, rubeola, tuberculosis, influenza y gripe (6). El dolor abdominal del dengue puede ser tan intenso que obliga al médico a hacer el diagnóstico diferencial también con apendicitis aguda u otro cuadro abdominal de tipo quirúrgico agudo, así como de otros procesos como adenitis mesentérica, litiasis renal o colecistopatía (7).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

Los primeros registros de epidemias por dengue datan de 1779, simultáneamente en Batavia (Jacarta), Indonesia y El Cairo, posteriormente se reportó en Filadelfia (1780). El primer brote de fiebre hemorrágica de dengue fue descrito en 1953 en las islas de las Filipinas y desde entonces esa región se encuentra entre las diez primeras causas de mortalidad en niños (5), encontrándose en ese país dengue tipo 2, 3 y 4, predominando el tipo 3 (6). A la región Centroamericana ingresó en 1978 describiéndose en Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua (5), un solo serotipo del dengue en América Central y en el Ca-

ribe originó epidemias en 1952, 1963, 1964, 1977 y 1981. Desde entonces, varios serotipos son endémicos en la mayoría de los países tropicales y subtropicales del continente Americano y regularmente se les encuentra asociados con brotes (4). En forma similar, el número de manifestaciones hemorrágicas ha aumentado en el Caribe, después de la gran epidemia en Cuba en 1981, donde de mayo a octubre causó 344,203 casos hospitalizados (5), 24,000 casos de fiebre del dengue hemorrágico y 158 muertes (4,9) (Ver anexo No 3). En Venezuela entre 1989 y 1990, se informaron 3,108 casos de fiebre de dengue hemorrágico con 73 defunciones, 2/3 partes de los casos fueron en niños menores de 14 años (5). En México se han descrito y documentado epidemias por virus del dengue desde 1978 que se han extendido en toda el área tropical y subtropical hasta los 1,280 metros sobre el nivel del mar. En general únicamente han sido ocasionadas por cepas del D-1, D-2 y D-3 y sólo se conoce un brote en Mérida en 1984 asociado a D-4 con 8 casos y 3 defunciones (4).

Guatemala es el país más septentrional del istmo americano, limita al Norte y Occidente con México, al Este con Belice y el Mar Caribe y al Sur con El Salvador y el Océano Pacífico. Está ubicado entre 13°3' y 18°3' latitud Norte y entre 92°30' y 88:00' de longitud. Esta situación es propicia para el desarro-

llo de enfermedades propias de los trópicos como Paludismo, Chagas, Oncocercosis, Dengue, etc. Se sabe de la existencia de *A. aegypti* desde 1,860 (5), pero es reconocido en 1978, ya que de agosto a noviembre de ese año se registró en Escuintla la primera epidemia reconocida de Dengue, como consecuencia de la pandemia declarada en el Caribe, Honduras y México. Ello motivó trabajos intensivos de control del vector para eliminarlo y en los nueve años siguientes la enfermedad fue totalmente controlada. Pero las medidas no fueron suficientes para detener el incremento progresivo de *A. aegypti* (5). La multiplicación de los factores ecológicos, estimulados por la creciente acumulación de recipientes y desechos industriales, especialmente llantas abandonadas, la gran capacidad de difusión de la especie, la pérdida de entusiasmo por el personal de campo para controlar el vector y la limitación de recursos del programa control, fueron determinantes para que así ocurriera (10). En el primer semestre de 1987 se reportó en Livingston un nuevo brote de dengue que aconteció en 8 localidades distintas ese año, hasta las 335 que se reportan en 1994 (11). Los tres departamentos donde no se ha detectado el vector son Quiché, Sololá y Totonicapán (5). Los serotipos circulantes son 1, 2, 3 y 4. En el último año se ha reportado solo el serotipo 3 (12). La identificación

de casos ha sido en base a los síntomas que presenta la población. Los datos sobre la distribución de la enfermedad se basan principalmente en la sospecha de casos, pero en un pequeño número el diagnóstico se ha logrado al enviar muestras sanguíneas a otros países como Honduras que cuenta con un laboratorio para el diagnóstico del dengue (3).

Tres factores han sido señalados como responsables del aumento en América de la transmisión del virus del dengue:

- 1.- Las fallas en el control del vector (9).
- 2.- Introducción y diseminación de nuevas cepas de virus debido al aumento de los viajes aéreos y de viajeros.
- 3.- Creación de condiciones ecológicas apropiadas en las ciudades subtropicales que permiten la coexistencia e interrelación de varios serotipos del virus (4).

En Guatemala los programas de control del vector se siguen haciendo mediante las medidas de control integrado: destrucción de fuentes, tratamiento focal con larvicidas, aplicación ambiental de imagocidas, estímulo del uso de peces en los tanques grandes y especialmente, la participación de la comunidad; pero la capacidad de cobertura es muy limitada y el dengue

generalmente aparece en las localidades que no han recibido atención previa o que han quedado por mucho tiempo sin atención (10).

En los diversos países del continente Americano se han realizado programas de control de *Aedes aegypti* y el reporte con que se cuenta, data de 28 ciudades hasta 1995 en donde se ha invertido un total de US\$ 103,825,798 (13) (Ver Anexo No.4).

En la actualidad, las vacunas contra los cuatro serotipos de dengue se encuentran en diferentes estadios de producción. Algunos investigadores consideran que necesitan otros cinco u ocho años para el desarrollo de vacunas efectivas. Para la elaboración de vacunas contra los virus del dengue es necesario dejar totalmente aclarados algunos aspectos relacionados con la patogenia de la enfermedad. Además, una vacuna contra el dengue debe ser segura, de bajo costo, tetravalente, producir mínimas reacciones secundarias, tener al menos un 85% de efectividad e inducir una inmunidad duradera (14).

3.3 TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD

La transmisión se realiza a través de un vector, el mosquito *A. aegypti* (6). Recientemente *A. albopictus*, el vector asiático del dengue, se ha establecido en áreas focales del Este de los Estados Unidos hasta los 42° de latitud Norte así como en Sudamérica (4), siendo

en Guatemala el segundo vector de dengue (15,16).

Estos vectores viven en aguas estancadas relativamente limpias o agua almacenada. La hembra del mosquito adquiere el virus después de picar a una persona infectada, este mosquito hembra se considera que es infectiva de 2 a 15 días, y puede sobrevivir hasta meses (6).

A. aegypti se ha encontrado en alturas de 2,200 mts SNM, mientras que anteriormente las áreas infectadas se localizaban hasta 1,200 mts SNM (6).

El crecimiento del número de localidades infestadas por *A. aegypti* es constante y a razón de 5% de nuevas poblaciones cada año: las 335 localidades con antecedentes de dengue en Guatemala tienen 1,005,524 habitantes en riesgo, de los cuales el 3.53% ha reportado los síntomas de la enfermedad (11). De 1973 a 1991 se había encontrado el vector en 803 localidades (aproximadamente 2,100 encuestas anuales) y todas las localidades eran tratadas exhaustivamente, logrando negativizar temporalmente al 39% de ellas. Para 1993, el 36% de las localidades infestadas ya han reportado casos de dengue (11).

3.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VECTOR:

Los zancudos adultos son de color negro con manchas

plateadas (11). Sus patas son anilladas de color negro y blanco. Los insectos llegan a sobrevivir de cinco a siete semanas, que son suficientes para crear el puente de la transmisión del virus (11). Tienen características fácilmente observables que permiten su identificación:

- a.- Son picadores diurnos: los mosquitos *A. aegypti* generalmente solo pican durante el día, a diferencia de otras especies que lo hacen en el crepúsculo o durante la noche. Se alimentan preferencialmente de sangre humana.
- b.- Son domésticos: las hembras requieren sangre humana para sus huevos y agua limpia para reproducirse y solo pueden subsistir bajo la protección tolerante de los seres humanos. Su hábitat es el ambiente protegido de las dependencias domésticas. Viven dentro o en los alrededores de la casa, donde cumplen todas sus funciones vitales: alimentación, reposo, oviposición, etapa larvaria, etc.
- c.- Solo se reproducen en recipientes artificiales: los recipientes más significativos en una infestación limitada son los toneles de hierro, las pilas de cemento, las llantas usadas y los depósitos de plástico. Cuando la infestación es

intensa, las larvas de *A. aegypti* se encuentran prácticamente en toda clase de recipientes artificiales que contengan agua.

d.- Resistencia de los huevecillos a la falta de agua: fueron dotados por la naturaleza para sobrevivir las condiciones estacionales, las hembras ponen sus huevecillos sobre las superficies duras del recipiente cuando tienen agua, donde quedan adheridos sobre la línea del nivel del agua y a medida que ésta se evapora, los huevecillos se secan pero se mantienen fértiles hasta que nuevamente se inundan con agua. Esta característica es la razón de la gran difusión de la especie: involuntariamente el hombre los ha llevado consigo a todos los lugares a donde lleva sus recipientes (11, 17).

3.5 TRATAMIENTO ESPECIFICO:

Para esta enfermedad no se conoce ningún tratamiento curativo (11), pero puede administrarse tratamiento para el dengue clásico sintomáticamente a base de antipiréticos, como acetaminofén o relajantes musculares y vigilar el estado de hidratación del paciente (6). En cuanto al dengue hemorrágico, el paciente debe ser hospitalizado, de preferencia en una unidad de cuidados intensivos para manejo del estado de

choque o de las hemorragias, condiciones graves que frecuentemente conducen a la muerte (Ver Anexo 5) (6).

3.6 RESPUESTA INMUNOLOGICA

Los anticuerpos neutralizantes aparecen varios días (5-7) después del inicio de la enfermedad y persisten años o pueden permanecer toda la vida. Después de la recuperación deja una inmunidad sólida para el serotipo homólogo que tiene carácter permanente la inmunidad heteróloga aparece en periodos iniciales, pero desaparece con rapidez (6).

Los anticuerpos IgM son producidos transitoriamente, su detección en suero indica infección activa reciente. La IgG también se produce en la infección primaria y secundaria, pero en esta última es mayor que en la primaria. La respuesta inmune del ser humano enfermo de dengue se manifiesta por aumento de anticuerpos anti-dengue y aumento de los linfocitos T sensibilizados hacia el serotipo del virus implicado (18).

4. METODOS DIAGNOSTICOS DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico es difícil, principalmente en lugares donde existen enfermedades que pueden simular el cuadro. Por eso se han definido dos situaciones: El caso sospechoso y el confirmado (5).

La diferencia entre ambos es la confirmación por pruebas de laboratorio, como las serológicas, virales o moleculares (5).

4.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Las técnicas serológicas constituyen un auxiliar imprescindible en el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil que resulta en la mayoría de los casos lograr el diagnóstico por aislamiento viral (6).

Para el diagnóstico de los virus se han aplicado pruebas serológicas que por su amplio uso se consideran como técnicas clásicas (6). Tal es el caso de la inhibición de la hemaglutinación (IH), (ésta es la más recomendada por su alta sensibilidad, fácil realización y bajo costo) (5), la fijación del complemento (FC) y la neutralización (NT) (6). En años recientes se han introducido técnicas de mayor sensibilidad y facilidad de ejecución, que han ido ganando terreno en el campo del diagnóstico en virología, sobre todo por lograr resultados rápidos (5). Entre ellas se encuentran los inmunoensayos enzimáticos (EIA) (1) y de éstos el EIA sobre fase sólida ha alcanzado una gran utilización en el diagnóstico de otros virus como hepatitis, rubeola, citomegalovirus y otros (6), existiendo para su identificación antígenos producidos por Centros de Re-

ferencia Internacional (19). Incluyendo entre estos la técnica de EIA de membrana que se han popularizado como pruebas rápidas (20).

Después de una infección por dengue, la IgG se eleva, para luego disminuir hasta cierto nivel en el cual se mantiene durante años o hasta de por vida, por lo que se puede utilizar para estudios epidemiológicos en los cuales se quiere conocer la población que ha estado expuesta al virus. En caso de una segunda infección, la IgG se puede incrementar hasta diluciones de 1:2,400 o más (5). Los estudios realizados con EIA han demostrado que posee una alta sensibilidad similar a la inhibición de la hemaglutinación. Sin embargo este último tiene problemas al enfrentar el suero de los pacientes que esten en la fase convalesciente de la infección (20,21). El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual es una amplificación de ADN *in vitro* (22), ha facilitado un gran número de diagnósticos de diversas enfermedades incluyendo los virus de dengue. En este método se realiza una importante variación del PCR para facilitar el análisis de ARN (RT-PCR). Esta variación consiste en dos pasos: conversión del ARN en ADN por la enzima transcriptasa reversa seguido de la amplificación del ADN por la Taq polimerasa. Este método se ha optimizado para obtener la amplificación simultánea de los 4 virus de dengue,

en un PCR múltiplex, permitiendo en 24-48 horas la detección y serotipificación del virus causante de la enfermedad (22a). El PCR múltiplex para dengue usa un primer 5' común para los 4 virus, un primer 5' específico para cada uno de los virus de dengue (1,2,3,4,).

Este método es particularmente atractivo porque es rápido, sensible, específico y permite diferenciar el serotipo infectante en un día ó dos, además se utiliza suero de pacientes con los primeros días de la infección, en comparación con otras técnicas serológicas en donde el paciente necesita dos semanas de haber contraído la enfermedad. Entre sus desventajas se cuenta con que es necesario poseer una infraestructura adecuada y personal capacitado para su realización (22a).

En Guatemala se está comercializando el método para el diagnóstico serológico de dengue por medio de la técnica semi-cuantitativa Dip-s-ticks para la detección de anticuerpos IgG e IgM, el cual consiste en tiras de nitrocelulosa con antígeno viral que detectan anticuerpos IgG ó IgM en suero del paciente. Este método tiene una sensibilidad de 89.6% y especificidad del 94.3 % en comparación con el método de referencia de la inhibición a la hemaglutinación en sueros estudiados en Perú y norte de México, los que incluyeron pacientes en la fase aguda y convalesciente (23).

4.- INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

La técnica de anticuerpos fluorescentes se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo. Se considera fluorocromo una sustancia que al ser excitada por una onda luminosa es capaz de emitir luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la onda que provoca la excitación. El fluorocromo de más amplia aplicación en esta técnica es el isotiocianato de fluoresceína. En 1,941 Coons y colaboradores introdujeron la técnica de IF; posteriormente las técnicas de conjugación fueron modificadas por Riggs y colaboradores, reemplazando el isocianato por el isotiocianato, el cual es más estable, más fácil de conjugar y de obtener comercialmente. Desde los años 50, la IF ha sido ampliamente utilizada para la identificación de bacterias, parásitos y virus (15).

El principio de esta técnica se basa en que las moléculas proteicas de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de enlaces químicos covalentes, que no alteran esencialmente la actividad inmunológica de estos anticuerpos, manteniendo íntegramente su capacidad de unirse a los antígenos homólogos. En el método indirecto el anticuerpo primario (no marcado) se añade sobre la muestra y el anticuerpo secundario (marcado) se combina con el

complejo Ag-Ac primario. Si la fluorescencia es específica, se puede identificar el antígeno cuando se conoce el anticuerpo primario o viceversa (15). Este método en comparación con el directo, presenta 3 ventajas:

- 1.-Es más sensible.
- 2.-Sirve para detectar tanto antígeno como anticuerpo.
- 3.-Se puede trabajar una amplia variedad de Ag-Ac siempre que se utilicen sueros de la misma especie (15).

4.1.2 HEMAGLUTINACION

Ciertos virus aglutinan los glóbulos rojos. La hemaglutinación es la unión de los eritrocitos producida por el virus o por alguna estructura del mismo. El resultado visible de la hemaglutinación viral es un patrón formado en el fondo del pozuolo por los eritrocitos unidos por la hemaglutinación viral.

En la hemaglutinación directa el virus actúa directamente sobre las células y esta propiedad puede ser inhibida por anticuerpos específicos contra virus (24). En el caso del dengue, la propia partícula viral es la hemaglutinina, no existiendo enzima destructora del receptor como en los orthomyxovirus. Los anticuerpos poseen una amplia reactividad de grupo por lo que la prueba de inhibición de la hemaglutinación se utiliza para clasificar a los mismos en grupos antigénicos

(15).

4.2. AISLAMIENTO DEL VIRUS DE DENGUE

La era moderna de la virología del dengue inició con el desarrollo del modelo de infectar al ratón lactante. Kimura y Hotta (25) fueron los primeros en reportar la adaptación de las cepas de denguevirus en ratones albinos suizos. Por otro lado Sabin y Schlesinger (19) adaptaron cepas *Hawaii* (serotipo-1) en ratones de dos semanas de edad y demostraron que las cepas adaptadas mantenían las mismas características serológicas que las silvestres (4,12). Ambos grupos de investigadores encontraron que algunos virus introducidos al ratón, estaban atenuados en cuanto a capacidad para enfermar a humanos. Meil y colaboradores (19), sugirieron el uso de ratones recién nacidos para el cultivo de denguevirus y consiguieron la adaptación del serotipo 2 (26).

Uno de los sistemas de aislamientos biológicos más empleados en el aislamiento del virus dengue, a pesar de su baja sensibilidad ha sido en el ratón lactante inoculado por vía intracraneal (27). Esta es la vía más sensible, especialmente en el animal lactante de 1-2 días de edad y cuando se inocula una cepa bien adaptada el animal muere de encefalitis K, después de una semana, dependiendo de la dosis inicial (4).

Utilizando este sistema se logró la producción de

antígeno del dengue tipo 2, realizado con la colaboración de la Facultad de Medicina de la Universidad San Carlos y el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), confirmándose por medio de PCR (2). También se ha utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos incluyendo células B5C1, VERO, BHK-21, LLCMK2 (27). El efecto citopático va desde severo hasta inaparente, dependiendo de la línea celular (4). En los últimos años se ha desarrollado una serie de líneas celulares de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus en comparación con los sistemas anteriores (27). Dentro de las más utilizadas están las células AP-61 (*A. pseudocutellaris*), C6/36 (*A. albopictus*), TRA-284 (*Toxorhynchites a. boinesis*) (4), siendo estas últimas las más sensibles. La elevada sensibilidad de estos sistemas ha permitido alcanzar un alto índice de aislamientos (27). En varios casos no se observa el efecto citopático en las células, por lo que entonces se aplican métodos de monitoreo viral como síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, hemadsorción, inmunofluorescencia e interferencia (26).

4.2.1 LINEA CELULAR C6/36

La línea celular C6/36, es un clon obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967) (28), que tiene

una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya. En estudios realizados recientemente (Kuno et al. 1985)(28) se ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos tales como AP-61 y las TRA-284. Aunque algunas cepas de dengue son capaces de producir efectos citopáticos de tipo sincitial, en las C6/36, este fenómeno no es característico de la línea (29). Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados (15).

Uno de los estudios realizados en Japón demuestra que con estas células es posible la obtención de antígeno viral serotipo 2 y 3 tanto a 30°C como a 37°C; el serotipo 4 no fue detectable en esas condiciones y el dengue serotipo 1 no da un alto índice de cuantificación viral (30).

El primer estudio realizado en Guatemala en cuanto a aislamiento e identificación viral fue realizado por la Dra. Lucrecia de Escalante como parte del Proyecto de Cooperación Guatemala-Japón para la investigación de Enfermedades Tropicales (JICA) en 1994, la cual utilizó la células C6/36 para el aislamiento viral y su posterior confirmación con inmunofluorescencia. Se comprobó la presencia de tres serotipos de dengue en el país: serotipo 1 (12 casos), serotipo 2 (2 casos) y serotipo 4 (1 caso), dando un total de 15 casos identificados de

70 muestras inoculadas en las células (29).

Otro estudio recientemente realizado donde utilizaron el cultivo de células C6/36 fue para producir antígeno del virus dengue y titulación del virus para la técnica de ELISA, éste fue realizado en el departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Nagasaki Japón, durante 1994 y principios de 1995 (18). En Guatemala se reprodujo el método realizado en Japón, con algunas modificaciones de acuerdo a las condiciones de nuestro país, obteniéndose antígeno viral para Dengue 1 y 2 con cepas guatemaltecas, con un título en IHA mayor de 128 unidades, pero no les fue posible producir antígeno para el serotipo 3 y serotipo 4 a ninguna temperatura estudiada las cuales fueron 28°C, 32°C y 37°C (31). Estudios realizados demuestran la producción eficaz del dengue 2 con esta línea celular como el realizado por Castillo, et al. en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, en donde con la técnica de Inhibición a la hemaglutinación presentó un título de 1:160 (2).

4.2.2. LINEA CELULAR VERO

Es un sistema celular de mamífero proporcionado por el riñón del mono verde africano (28). En un estudio realizado en Bethesda (USA) utilizaron virus semilla del dengue, infectando células Vero para la realización

de antígeno de Dengue (en la literatura consultada no indican si utilizaron cajas roux o citocultivadores manuales), posteriormente se examinaron anticuerpos en una placa de EIA, presentando esta placa un tiempo de incubación de aproximadamente 3 horas, en donde se comprobó una sensibilidad de 95.2% y una especificidad de 100% para IgG, mientras un 97.5% de sensibilidad y un 100% de especificidad para anticuerpos contra IgM, demostrando que estas células producen una alta cantidad de antígeno viral (32).

5. JUSTIFICACION

La prevalencia de dengue en Centroamérica ha ido en aumento según lo informado por la OPS y ha alcanzado niveles considerados de emergencia. En Guatemala en el año de 1996 se presentaron 18 casos de dengue hemorrágico en Escuintla (12).

El diagnóstico viral preciso provee información para conocer la prevalencia de la enfermedad, demostrar si la enfermedad se ha controlado o introducido en nuevas áreas y ayuda al tratamiento del paciente evitando así que le administren antibióticos innecesariamente. Es por ello importante hacer la detección a tiempo en todos los lugares del país, utilizando una técnica rápida, sencilla y que no necesite infraestructura sofisticada para su realización y a la vez esté al alcance de la economía del país. El contar con resultados oportunos fortalecerá la vigilancia activa y eficaz de esta enfermedad. Por tal razón se desarrolló la producción de antígeno de dengue, para estandarizar la prueba de inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (EIA) de membrana. De esta manera se espera desarrollar una prueba de bajo costo que esté al alcance de los laboratorios del país, especialmente donde el dengue es endémico.

6.OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener y producir en Guatemala el antígeno de dengue que se utiliza en la prueba serológica del inmunoensayo enzimático sobre fase sólida.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar la capacidad para producir en citocultivadores manuales el antígeno de dengue para su diagnóstico serológico.
- Elaborar tiras reactivas de papel pre-filtro en donde se evaluará el antígeno realizado.
- Comparar los resultados obtenidos con el método comercial dengue-s-ticks.

7. HIPOTESIS

Que al menos exista 0.75 de concordancia según Kaappa entre el antígeno de dengue producido comparado con los resultados obtenidos por un método comercial dengue -s- stick.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Virus semilla y sueros conocidos.

8.2 RECURSOS

Humanos:

- * Br. Klelia Xiomara Dominguez Guerrero
- * MSc. Olga Torres de Matute
- * Personal profesional y técnico del Laboratorio de Virología y Microbiología, " Laboratorio Leonardo Mata", del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).

Institucionales:

- * Laboratorio de Virología e Histocultivos del Programa de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).

Físicos:

Equipo:

- Campana de Flujo Laminar y luz ultravioleta
- Incubadoras 28°, 32°C y 37°C con CO₂
- Balanza Analítica
- Baño de María a 37°C y 57°C
- Pipetor Automático
- Termómetros
- Equipo de filtración
- Rotador eléctrico
- Microscopio binocular e invertido
- Microscopio de fluorescencia
- Contador de células
- Centrífuga refrigerada a 4°C
- Equipo de microtitulación
- Placas desechables de fondo U
- Micropipetas de 25 ul
- Potenciómetro

Cristalería:

- Beakers 50, 100, 500 y 1,000 ml
- Botellas de roux (especiales para cultivo viral) de 25 y 75 ml
- Citocultivadores manuales
- Frascos de vidrio graduados
- Pipetas de 1,2,5 y 10 ml

- Pizetas
- Bandejas plásticas para descarte
- Ampulas de plástico
- Vaso Koplín
- Porta Objetos para Inmunofluorescencia
- Cámara de Neubauer
- Probetas de 10, 50, 100 ml.

Medios y Reactivos:

- Medio base de crecimiento MEME
- Suero Bovino Fetal (SBF)
- Nitrógeno líquido
- Alcohol 95%
- Dimetil sulfóxido DMSO
- Acetona
- Azul de Evans
- Anticuerpos monoclonales Anti-dengue 1,2,3 y 4
- Anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina (Anti-ratón)
- Solución salina al 0.9%
- Azul de tripán

8.3 PROCEDIMIENTO

8.3.1 Descongelación de Células:

Se sacó el ampula del nitrógeno líquido y se

colocó directamente al agua a 37°C (baño María) hasta que se descongeló su contenido. Con una pipeta de 1 ml se extrajo el contenido del ampulla y se adicionó a una botella conteniendo 4.9 ml de medio de crecimiento. Se incubó a 30°C por 24 horas.

Se cambió el medio de cultivo para eliminar el DMSO (dimetil sulfóxido), cuando la monocapa estaba completa se pasaron las células con división inicial de 1:2 (de una botella se obtienen dos).

8.3.2 Siembra de las Células en frasco Roux:

Se decantó el medio de un frasco Roux con monocapa confluyente, se procedió a desprender las células con 3 ml de medio de crecimiento de forma que caiga perpendicular a la monocapa celular, a continuación se adicionó 0.1 ml de células a 0.3 ml de azul de tripán y se realizó el recuento celular.

350,000 células/ml se adicionaron a 20 ml de medio, y se incubó a 30°C en CO₂ al 5%. La monocapa estuvo completa en 4-5 días.

8.3.3 Inoculación de las células:

Se realizó una serie de varias cajas con células a una concentración de 350,000 cel/ml incubándose por 48 horas a 30°C. A continuación se procedió a inocular 0.2 ml de virus semilla a cada caja, observando el efecto citopático durante 14 días.

8.3.4 Siembra de las células en citocultivadores:

Para 100 ml de medio de cultivo se agregaron 0.3 g de cytodex (Wheaton science products, Pharmacia biotech AB, Uppsala, Sweden) siendo éste el microtransporte que son perlas blancas con una densidad de 1.04, tamaño 170um y con un área de 135-200 cm²/g, ya humedecido con PBS (Anexo 6). Al cytodex se le inocularón 5×10^4 células/ml y se agitaron de 20 a 60 rpm por 2 minutos, se agregó al recipiente agitador 300 ml de medio de cultivo MEMH suplementado, se mezcló suavemente durante 2 minutos con periodo de reposo de 30 minutos por 24 horas y se incubó a 30°C en CO₂ al 5%. La agitación continuó hasta que las células se adhirieron firmemente al microtransporte. El periodo de tiempo requerido para esta adhesión fué de 4 días. El volumen se incrementó entonces a 500 ml de medio de cultivo.

Se obtuvieron muestras representativas y se examinaron microscópicamente. Se adicionó virus semilla a los cuales se les realizó dos pasajes previos cada uno con 8 días de incubación para aumentar su concentración, a razón de 30 ml por cada 1,000 ml de medio y se dejaron incubar a 37°C por 4 días más, se obtuvo el antígeno y se almacenó a -70°C.

8.3.5 Recolección de las células del citocultivador:

Se dejaron sedimentar los microacarreadores, remo-

viendo el medio de cultivo, se lavaron por 5 minutos con PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} , conteniendo 0.02% de EDTA. A continuación se removió el EDTA-PBS (aproximadamente 30 ml/g de cytodex), se mezcló bien la solución y se agitó ocasionalmente. A continuación se agregó 10 ml de tripsina que ayuda a desprender las células de los microacarreadores.

Después de 15 minutos, la tripsina que contiene el medio de cultivo se detiene por adición de medio conteniendo suero y las pocas células que permanecieron adheridas a los microtransportes se desprendieron por agitación suave. A continuación se filtró el sobrenadante y se almacenaron los microacarreadores para su posterior uso.

8.3.6 Congelación de células:

Se adicionaron 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de suero bovino fetal (SBF) en un frasco de 10 ml rotulado como # 1 y se colocó en un baño de hielo. Se agregaron 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) en otro frasco de 10 ml rotulado como #2, colocándolo en baño de hielo. Se decantó el medio de una botella Roux y con una pipeta de 5 ml se extrajeron 5 ml del frasco # 1 y con ello se desprendieron las células del Roux. Se adicionó con una pipeta 5 ml del medio del frasco # 2 al frasco anterior gota a gota con agitación. Se adicionó 1 ml de la suspensión

celular en cada ampula de congelación (todo se trabajó en baño de hielo). Se dejó 0.1 ml para prueba de esterilidad. A continuación se almacenaron las ampulas durante 1 hora a -20°C ; transcurrido este tiempo se pasaron las ampulas a una caja de poliespuma y se almacenaron a -70°C toda la noche. Al día siguiente se trasladaron las ampulas a nitrógeno líquido para su conservación.

8.3.7 Tinción para inmunofluorescencia:

Se descartó el medio de crecimiento del tubo a examinar, lavándose con PBS (pH 7.2) dos veces para desprender el monostrato; se colocó una gota de la suspensión a cada pozo del portaobjeto para IF dejándose secar a temperatura ambiente.

A continuación se colocó el porta objeto en el vaso Koplín agregándose acetona a -20°C durante 10 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente. Después se adicionó a los pozos 1-2-3-4 una gota de suspensión de anti-dengue 1-2-3-4 respectivamente, y a los pozos 5-6-7-8 monoclonal, colocándolas en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C .

Al transcurrir el tiempo se lavaron las láminas en el vaso Koplín con PBS (pH 7.2) dos veces, colocándolas después en un rotador durante 10 minutos, se secaron rápidamente a temperatura ambiente y se adicionó una gota de la suspensión de anti-ratón, colocándola en

cámara húmeda a 37°C durante una hora. Lavándola después en el vaso Koplín con PBS (pH 7.2) dos veces, colocándola nuevamente en un rotador durante 10 minutos.

Después de este tiempo se secaron las láminas colocándolas dentro de un vaso de Koplín conteniendo Azul de Evans por 2 minutos, se secaron las láminas y se observaron en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de inmersión.

8.3.9 Preparación de tiras reactivas

Se prepararon tiras reactivas de 0.5 cm de ancho por 4 cm de largo usando papel pre-filtro, a éste se le adicionaron 10 ul de antígeno preparado en el siguiente orden: el primer pozo control positivo, el segundo control negativo, tercero D-1, el cuarto D-2, el quinto D-3 y al sexto D-4 con 5 ul de suero a todos los pozos y se dejaron secar.

8.3.10 Tiras comerciales usadas como control

Se utilizó el método comercial dengue -s- stick, debido a que es una metodología sencilla y se encuentra disponible en nuestro país. Con las tiras preparadas y las tiras comerciales se procedió según el siguiente diagrama de flujo:

* Se adicionaron 40 ul de anti-human IgG marcado con fosfatasa alcalina y 10 ul de muestra al reactivo # 1 se incubó por 38 minutos a 50°C. Al terminar el tiempo

se lavó la tira con agua destilada por 15 seg.



* Se adicionaron 2 ml del iniciador (consiste en cloruro de sodio) por 5 minutos a 50°C, se lavó la tira con agua destilada por 15 seg.



* Se adicionaron 2 ml de conjugado con fosfatasa alcalina por 18 minutos a 50°C. Se lavó la tira por 10 minutos en agua destilada.



* Se adicionaron 2 ml de desarrollador de la reacción (consiste en NBT+BCIF) por 5 minutos. Se lavó la tira con agua destilada por 10 seg.



* Si se observaba un punto morado a la reacción se toma como positivo a dengue virus, de lo contrario es negativo. Después se compararon los resultados, con los obtenidos por un método comercial dengue-s-stick (Ver Anexo No 7).

8.3.11 Sueros utilizados

Se utilizaron un total de 40 sueros, de los cuales 21 eran positivos para dengue virus y 19 negativos utilizando el método EIA, estos sueros fueron proporcionados por el INCAP obtenidos de El Salvador y de la facultad de Medicina de la USAC, conservandose a 70°C.

8.3.12 Caracterización del antígeno

Se utilizó el método de Biuret, con 1 ml de reactivo para 20ul de muestra, se incubó 10 minutos a 25 °C y realizó la lectura a una longitud de onda de 546 nm.

9. RESULTADOS

9.1 CULTIVO CELULAR

Las células C6/36 proporcionaron una mayor cantidad de antígeno viral y permitieron a su vez una mejor recuperación celular en comparación con las células VERO, el inóculo viral inicial de D-1, D-2, D-3 y D-4 dependió de la cantidad de antígeno a producir si era en una caja roux este fué menor en comparación con los citocultivadores manuales que necesitaron una mayor concentración viral. Además se comprobó que este antígeno puede utilizarse para inocular nuevas células y aumentar la producción.

9.2 EIA DE MEMBRANA ELABORADO

Se utilizó papel prefiltro porque resultó que es más resistente a la temperatura, humedad y desarrolló mejor la reacción que la nitrocelulosa y con estas tiras elaboradas se obtuvieron los siguientes resultados:

EIA (Se consideró prueba
standar de oro)

		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
<u>TIRA INCAP</u>	POSITIVOS	16	5	21
	NEGATIVOS	4	15	19
TOTAL		20	20	40

El antígeno preparado para la detección del virus dengue para ser utilizado en la prueba de EIA de membrana presentó 0.55 de valor numérico y de acuerdo a Fleiss de 0.40 a 0.75 se interpreta como acuerdo intermedio aceptable, presentó 4 falsos positivos y 5 falsos negativos de un total 40 pacientes que fueron analizados con ELISA. La prueba desarrollada presentó 75 % de especificidad y 80% de sensibilidad, con un valor predictivo positivo de 76.2 % y un valor predictivo negativo del 80 %.

9.3 CONSERVACION DEL ANTIGENO PRODUCIDO

Cada lote de antígeno obtenido se congeló a -70°C para su posterior evaluación con la técnica de EIA de membrana, donde se obtuvo que a mayor veces se descongelaba el antígeno menor grado de sensibilidad y especificidad presentaba.

9.4 CARACTERIZACION DEL ANTIGENO

Se obtuvo de cada antígeno de dengue producido el siguiente valor de proteínas:

Dengue -1	0.85 mg/100 ml
Dengue -2	0.98 mg/100 ml
Dengue -3	0.65 mg/100 ml
Dengue -4	0.80 mg/100 ml

DISCUSION DE RESULTADOS

El antígeno preparado presentó 76.2% de valor predictivo positivo y 79% de valor predictivo negativo comparado con 97.9% y 100% respectivamente con el método EIA de referencia usando anticuerpos monoclonales del CDC. El dato obtenido no refleja la prevalencia e incidencia de la enfermedad en nuestro país, porque se obtuvo de un número pequeño de casos, con un 50% de casos positivos y 50% de casos negativos, seleccionados con el fin de evaluar el acuerdo de la prueba realizada con la prueba estándar. El antígeno se produjo por primera vez en cultivo celular y no en ratones en nuestro país. Observamos que la producción de antígeno de dengue en citocultivadores se ve afectada por diversos factores: el antígeno producido infecta eficientemente las líneas celulares C6/36 y VERO, para el uso de estas células se prefiere se trabaje con las células C6/36 ya que se multiplican eficientemente y rápidamente en los medios de cultivo utilizados, son más fáciles de trabajar y no se contaminan con tanta facilidad como las células VERO. Otro factor importante es la cantidad de virus semilla de los serotipos de dengue que hay presente en el inóculo de las cepas semilla, ya que si existe poco virus no se obtiene una cantidad suficiente como para inocular los citocultivadores manuales que llegan a producir hasta por litros el antígeno, dependiendo de la cantidad de medio

y microacarreadores utilizados. Antes de utilizar los citocultivadores manuales se procedió a cultivar las células en caja roux, dando un buen crecimiento celular y se puede recuperar hasta 200 ml de antígeno dependiendo del tamaño de la caja. Tanto el antígeno obtenido en caja roux como el obtenido en el citocultivador presentan el mismo grado de infectividad, sólo hay diferencia en el volumen que proporcionan.

Cuando se utilizan los microacarreadores que son en forma de perlas blancas se observa crecimiento celular alrededor de cada una de ellas en el microscopio, cuando se observa un abundante crecimiento se le infecta con el virus dengue. La obtención de una alícuota de microacarreador del citocultivador, para observar el crecimiento celular a su alrededor en el microscopio debe ser en campana de flujo laminar y con la debida precaución para no contaminar el medio, cuando se trabaja con cajas roux no es necesario este procedimiento sino únicamente se observa al microscopio invertido el monostrato de la caja, evitando así una posible contaminación y pérdida del mismo. Una vez el antígeno fue obtenido se procedió a colocar manualmente 10ul de cada tipo en tiras de papel prefiltro y nitrocelulosa, la nitrocelulosa no absorbió el antígeno ya que al final del procedimiento no se observó ninguna reacción. El papel prefiltro sí absorbe el antígeno y es capaz de soportar todas las lavadas que se realizan en el procedimiento de EIA. Esta metodología se ve afectada por el tipo de reactivos a utilizar debido a que una de las fases claves es la incubación del antígeno con el conjugado de

fosfarasa alcalina ligada a anticuerpos anti-IgM humano de cabra, dando lugar a que el antígeno sea capturado entre la fase sólida y el conjugado, el conjugado que no haya sido ligado se lava con agua destilada, sin embargo si el conjugado utilizado no es de buena calidad, el resultado no es satisfactorio. En este estudio se utilizó conjugado comercial marca SIGMA, se recomienda probar otros conjugados. Si el medio de cultivo utilizado es rico en proteínas, se forma un "fondo" de color morado muy grande, el cual se trató de eliminar infructuosamente con una preincubación con albúmina. Esta misma reacción ha sido observada por productores de reactivos en los Estados Unidos (Msc. Buchanan Ian, PATH, comunicación personal). Es preferible utilizar para este tipo de pruebas, un antígeno recombinante obtenido libre de residuos de cultivo, o bien purificar el antígeno con una columna de afinidad previo a usarlo. Este procedimiento puede llevarse a cabo con las tiras elaboradas con cada uno de los antígenos por separado colocando un serotipo viral en cada pozo, para un determinado paciente, identificando así no solo si el paciente presenta la enfermedad, sino a la vez que serotipo viral está circulando o bien realizar un pool de antígenos con los cuatro serotipos virales donde se obtendría sólo si el paciente presenta la infección y no se conocería cual de los cuatro serotipos de dengue viral lo infectó. Otra ventaja del EIA de membrana es que se realiza en 45 minutos y solo se requiere de un baño María a 50°C, comparado con el EIA de referencia que se realiza en 75 minutos y se requiere de un lavador y lector de pozos especiales

para obtener resultados confiables. En conclusión sí es factible llegar a obtener otras alternativas sencillas, eficaces y de bajo costo, que permiten la detección oportuna, sensible y específica de anticuerpos contra D-1, D-2, D-3 y D-4 en sueros de pacientes en quienes se sospecha de esta enfermedad.

10.-CONCLUSIONES

- * La prueba de EIA desarrollada con antígeno de dengue preparado localmente, presenta un aceptable índice de concordancia con un método comercial disponible en Guatemala.
- * Al utilizar los citocultivadores manuales se produce una gran cantidad de antígeno. Sin embargo, como cada prueba solo se necesitan 50 ul, se puede producir en botellas de roux.
- * La utilización de células C6/36 da un alto índice de producción de antígeno y recuperación celular.
- * El papel prefiltro es más resistente a la temperatura, humedad y es más fácil su manejo que la nitrocelulosa, además de absorber el antígeno y desarrollar correctamente la reacción.
- * En nuestro país si se puede llegar a obtener con una infraestructura adecuada otras alternativas sencillas, eficaces y de bajo costo que permiten la detección oportuna, sensible y específica de anticuerpos contra D1, D2, D3 y D4 en sueros de pacientes en quienes se sospecha esta enfermedad.

11.-RECOMENDACIONES

- * Mantener el antígeno a -70°C y en alícuotas pequeñas (100 ul) para su conservación y al descongelarlo mantenerlo siempre con bandeja de hielo, evitando así su degradación.
- * No congelar y descongelar el antígeno viral más de una vez, debido a que pierde sus propiedades antigénicas.
- * Utilizar células C6/36 para la producción del antígeno por su facilidad de manejo y bajo grado de contaminación.
- * Evaluar la estabilidad del antígeno periódicamente para conocer el tiempo de degradación y utilización del mismo.
- * Incrementar la escala de producción de estas tiras y los reactivos necesarios para la prueba de EIA, para que el antígeno producido sea utilizado y ayude al diagnóstico del dengue en nuestro país.
- * Realizar estudios de campo para conocer la aplicación de la prueba y la prevalencia e incidencia de la afección en Guatemala.

12.REFERENCIAS

- 1.- Ramudo G, et al. Comparación de la técnica de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida para el diagnóstico serológico del dengue, *Med Trop.*,1988;38:7-14.
- 2.- Castillo L, Torres O, Bran E. Producción de antígeno de Dengue II en cerebro de ratón lactante,(Memorias Congreso Enfermedades Tropicales Guatemala) 1995 p.161-162
- 3.- Estrada C. Biología-Relación con enfermedades y control de *Aedes albopictus*. Organización Panamericana de la Salud 1995 p. 32-33
- 4.- Zarate M. Problemas para lograr una vacuna contra el dengue, Mexico: Secretaría de salud, subsecretaría de consejo y desarrollo, 1992 p.395- 405
- 5.- Mata F, et al. Seroepidemiología del dengue en Guatemala, (Memorias Enfermedades Tropicales Guatemala) 1994 p. 153 -156

- 6.- Caracterización clínica y epidemiológica del dengue en áreas endémicas de Guatemala, División de malaria Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala, febrero 1992.
7. Meneses S. Manejo Hospitalario del dengue Hemorrágico; Guatemala: Hospital Nac. de Coatepeque 1996 p. 5-6
- 8.- Hayes C, et al. Dengue infections in the Philippines clinical and virological findings in 517 hospitalized patients, Trop Med.,1998;38:110-116.
- 9.- Gubler D.J. Emergence of Epidemic Dengue/Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas, Infections Agents and Disease,1994;2:383-393.
- 10.-Molina P. Status del Mosquito *Aedes aegypti* en Guatemala, (Memorias Enfermedades Tropicales en Guatemala) 1992 p. 9-13
- 11.- Molina P. Control de *Aedes aegypti* en Guatemala, (Memorias Enfermedades Tropicales Guatemala) 1994 p. 147-152
- 12.- Torres O. Social Mobilización es an approach to

prevention and control of dengue in Guatemala,
Guatemala, december 1998 p.5

13.- Feasibility of eradicating *Aedes aegypti*. Pan
American Journal of Public Health, january 1997;1: 68-
70

14.- Martinez E. Dengue hemorrágico en niños, Bogota
Colombia, junio 1990 p. 112-115

15.- Ogata K, et al. Observación de la dinámica de
población de *Aedes aegypti*, vector del Dengue en
Guatemala, (Memorias Enfermedades Tropicales Guatemala)
1995 p.163-175

16.- Ogata K, et al. Hallazgo de *Aedes albopictus* el
segundo vector de Dengue en Guatemala, (Memorias
Enfermedades Tropicales Guatemala) 1995 p.176-180

17.- Molina P. Vectores del Dengue en Guatemala,
(Memorias Enfermedades Tropicales Guatemala) 1992 p.
98-99

18.- Pinto M. Serología del Dengue, (Memorias
Enfermedades tropicales en Guatemala) 1992 p. 96-97

- 19.- Akira I, Castillo L. Producción de antígenos del virus del Dengue en cultivo de células C6/36 y titulación por la técnica Sandwich ELISA, Enfermedades Infecciosas, Guatemala 1995 p.157-160
- 20.- Bellini W. Measles IG and IgM enzyme immunoassays, Centers for disease control and prevention, Atlanta USA 1991 p. 3-4
- 21.- Fernandez, Vasquez. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro jul/sep 1990;85 (3):347-351
- 22.- Lanciotti R, et al, Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Journal of Clinical Microbiology, Mar 1992 p. 545-551.
- 22a.- Harris E. A low-cost approach to PCR. Oxford University Press, New York USA 1998 p. 3, 21-22.
- 23.- Indx dip-sticks dengue fever test, Integrated diagnostica, inc. Baltimore USA Oct. 1993
- 24.- Davis J. Basic cell Cultire a practical approach, edit. D. Rickwood, University Oxford 1994 p. 268-270

25.- Freshney R. Culture of animal cells, USA 1994
p.201-216

26.- Burleson, et al. Virology a laboratory manual, San
Diego California, 1992 p. 41, 130, 135.

27.- INCAP. Manual de diagnóstico de dengue,
Guatemala: Instituto de Nutrición de Centro América y
Panamá (INCAP) área de virología 1993.

28.- Schmidt, Emmons, Diagnostic Procedures for viral,
richettsial and chlamydial infections 6ta. edition
Washington, 1989 p. 55-818

29.- Escalante de L. Dengue en Guatemala Primeros
Aislamientos e Identificaciones virales, (Memorias
Enfermedades Tropicales Guatemala) 1994 p. 165-171

30.- Tesh R. A method for the isolation and
identification of dengue viruses, using mosquito cell
culture, Med Trop., 1980;28(6):1053-1059.

31.- Mohamed H, et al. Elevated Incubation temperature
enhanced Antigen production of Dengue type 2 and 3
viruse in the infected Aedes albopictus clone C6/36 cell

..
culture, Med Trop., March 1995;1:21-27.

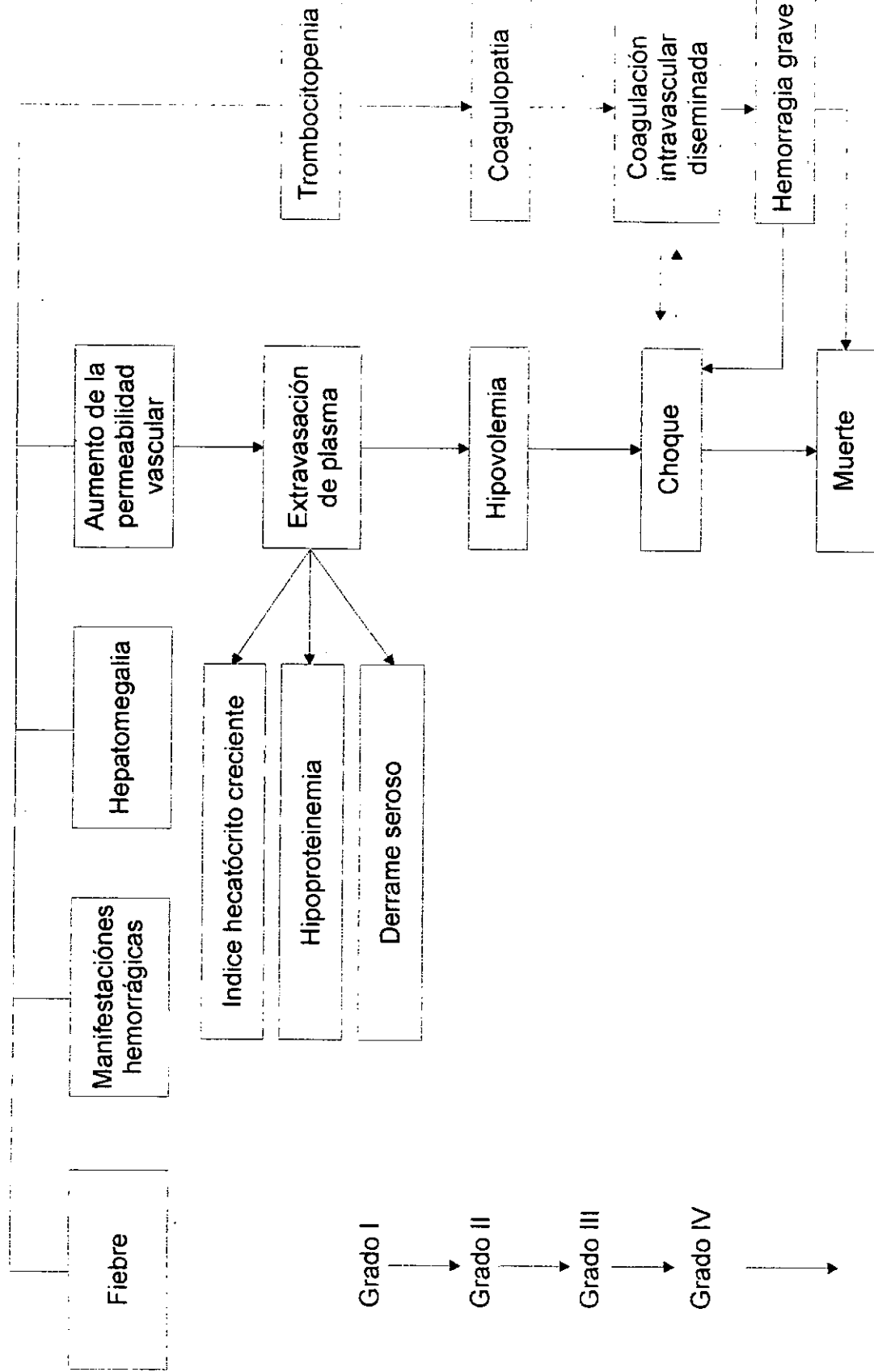
32- Wu S, et al, Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus, Clinical and diagnostic laboratory immunology, july 1997;4:452-457

ANEXOS

ANEXO No. 1

DENGUE Y DENGUE HEMORRAGICO

Infección por dengue



ANEXO No. 2

GRADOS DE DENGUE HEMORRAGICO

GRADO I:

- FIEBRE, HEPATOMEGALIA, EDEMAS, TORNIQUETE +, HT MAYOR 20% HT'HB MAYOR DE 3.5, TROMBOCITOPENIA DE MENOR DE 100000'MM.

GRADO II:

- LO ANTERIOR + HEMORRAGIAS ESPONTANEAS

GRADO III:

- + INSUFICIENCIA CIRCULATORIA

GRADO V:

- CHOQUE PROFUNDO

ANEXO No. 3

EL DENGUE EN AMERICA

ANTES DE 1981

1981- 1994



PAÍSES DE AMÉRICA (EN NEGRO) EN DONDE SE HA REPORTADO Y CONFIRMADO DENGUE HEMORRÁGICO, SE OBSERVA LA DIFERENCIA ANTES DE 1981 Y DE 1981-1994.

ANEXO No. 4

**INVERSION EN PAISES DE AMERICA PARA CONTROLAR Y
ERRADICAR EL DENGUE. HASTA 1995**

PAISES	INVERTIDO
NORTE AMERICA ^a	
MEXICO	3000000
CENTRAL AMERICA	
BELIZE	90000
COSTA RICA	1500000
EL SALVADOR	1000000
GUATEMALA	2100000
HONDURAS	1000000
NICARAGUA	5000000
PANAMÁ	1294000
CARIBE	
CUBA	20884658
DOMINICA	41000
REP. DOMINICANA ^b	231000
PUERTO RICO	1159342
AMOROSA DEL SUR ^c	
ARGENTINA	5950000
BOLOVIA	250000
BRAZIL	58591825
CHILE	12000
COLOMBIA	3610490
ECUADOR	1034483
PARAGUAY	185000
PIARIA	1200000
URUGUAY	10000
TOTAL	103825798

A. DATO OBTENIDO POR PAHO

B. HASTA EL 30 DE AGOSTO DE 1995

C. DATO OBTENIDO EL DOCUMENTO OPS/HPC/96.066

ANEXO No. 5

TRATAMIENTO

- ABUNDANTES LIQUIDOS PO Y DIETA NL
- ACETAMINOFEN
- NO USAR: ASA, OTROS AFINES, ANTIBIOTICOS, ANTIALERGICOS, NI ESTEROIDES, NO ANTIEMETICOS.
- SI VOMITA TRO
- SI NO TOLER PO DAR TRATAMIENTO IV
- NO USAR VIA IM
- USO DE MOSQUITERO
- REPOSO

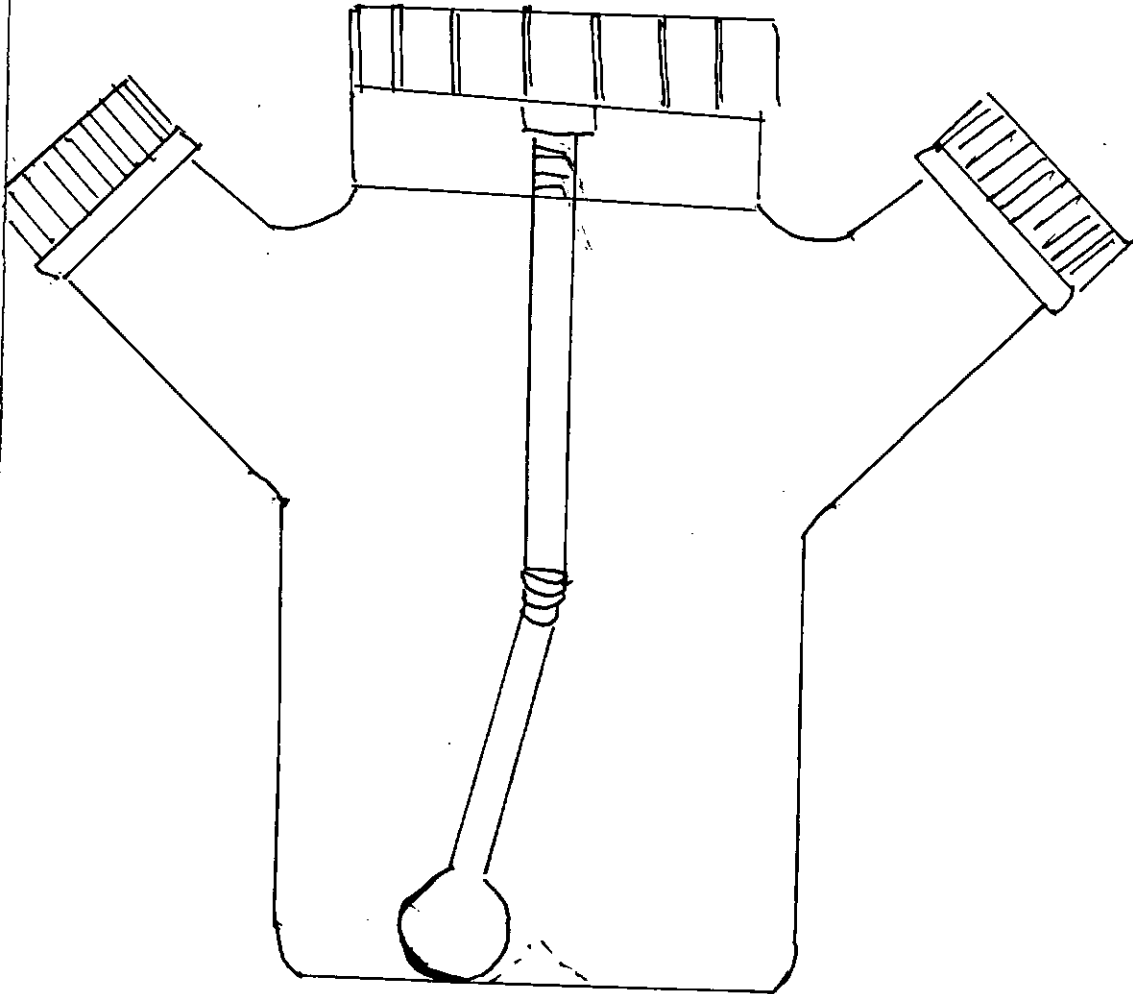
*****EXPLICAR SIGNOS DE ALARMA A FAMILIARES**

PERIODO CRITICO 3-5 DIAS***

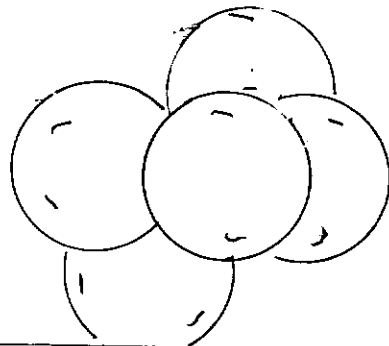
ANEXO No.6

PRODUCCION DE ANTIGENO DE DENGUE UTILIZANDO

CITOCULTIVADOR



MICROTRANSPORTE



ANEXO No. 7

TIRAS REACTIVAS EIA DE MEMBRANA

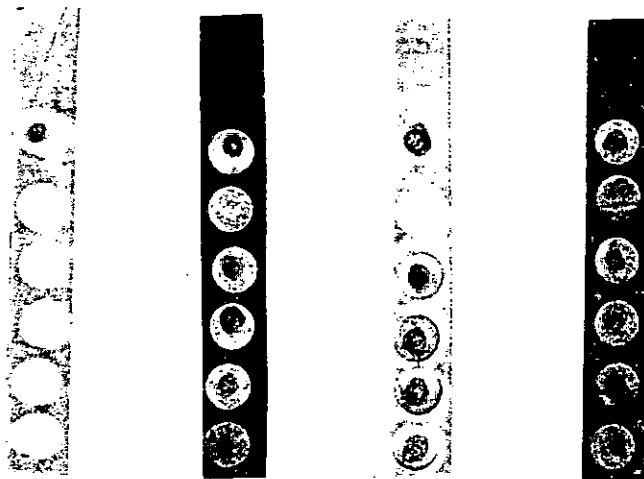
PARA DENGUE

CONTROL POSITIVO
CONTROL NEGATIVO

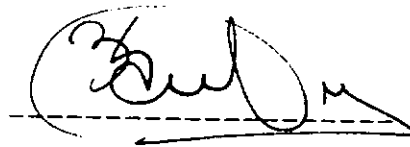


TIRA COMERCIAL UTILIZADA COMO CONTROL

CONTROL +
CONTROL -
DENGUE 1
DENGUE 2
DENGUE 3
DENGUE 4

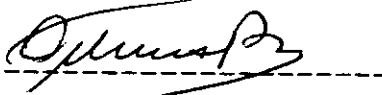


TIRA REACTIVA ELABORADA



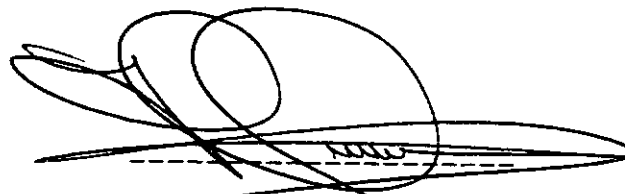
Br. KLELIA XIOMARA DOMINGUEZ GUERRERO

TESISTA



Msc. OLGA REBECA TORRES DE MATUTE

ASESORA



Lic. HEIDI ELKE LOGERMANN LIMA

DIRECTORA



Lic. HADA MARIETA ALVARADO BETETA

DECANA