

Guatemala, 28 de septiembre de 1997.

Dr. Raúl Castillo  
Director Centro de Investigación en Ciencias de la Salud  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Su Despacho.

Respetable Dr .Castillo:

Me permito enviarle a usted el informe final del Proyecto de Investigación "Caracterización clínica, aislamiento viral y determinación de anticuerpos en pacientes con diagnóstico clínico de dengue clásico y/o hemorrágico"; estudio realizado en pacientes atendidos por las Clínicas Familiares de la Facultad de Ciencias Médicas y en pacientes que residen en diferentes zonas de esta capital que fueron referidas a la Dirección General de Servicios de Salud, para efectuar diagnóstico de laboratorio.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio Multidisciplinario de Esta Casa de Estudios.

Atentamente;

Dra. Catalina Muñiz de González.  
Coordinadora del Proyecto.

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA,  
AISLAMIENTO VIRAL Y DETERMINACIÓN  
DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON  
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DENEGUE  
CLÁSICO Y/O HEMORRÁGICO.

Estudio realizado en pacientes atendidos por las clínicas familiares de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala; durante los meses de julio a octubre de 1,996.

GRUPO DE TRABAJO:

- Lic. Leticia Castillo S.
- Sra. Silvia López.
- Sra. Ruth Mota de Alvarez.
- Dra. Catalina Muñiz de González.

## MARCO TEORICO

**Definición de la enfermedad:** el dengue es una infección, que presenta un cuadro agudo, acompañado de fiebre y dolor muscular y articular; es transmitida por la picadura del mosquito *Aedes*, especialmente *A. Aegypti*. La complicación por mecanismos inmunológicos da origen al dengue hemorrágico.

### Agente de transmisión.

La identificación del mosquito *Aedes aegypti*, como vector del dengue fue realizada en el año de 1906 por Bancroft y posteriormente se identificaron otros 3 tipos de mosquitos como vectores de estos virus. Su capacidad de replicación viral ha sido ampliamente demostrada no sólo en mosquitos adultos sino también en larvas y cultivos de células de mosquito.

### Mecanismos de Transmisión.

El virus del dengue se transmite al hombre por la picada del mosquito. El hombre parece ser el único reservorio urbano del virus, aunque éste también ha sido aislado de los monos que se infectan naturalmente, los cuales juegan un papel muy importante en la transmisión selvática.

El *Aedes aegypti*, constituye el vector más importante, es doméstico y se alimenta de la sangre (hematófago). La rápida urbanización de las ciudades, a menudo resulta en la

proliferación de criaderos peridomésticos tales como: cauchos, latas, inadecuada disposición de los desperdicios de agua limpia o sucia, aunque prefiere las aguas relativamente limpias.

Recientemente se describió la presencia de *Aedes albopictus* en el territorio guatemalteco, especialmente en Izabal, lo que representa otro factor de riesgo más para la circulación del virus en el país. (1)

El mosquito vector hembra, se infecta alimentándose con la sangre que toma al picar a la persona infectada, luego de un período de 8 a 10 días el mosquito es capaz de transmitir la infección a una persona sana.

## Epidemiología.

La amplia distribución que ha logrado obtener el virus dengue y su alta morbilidad, especialmente en lo que se refiere al dengue hemorrágico, lo han convertido en uno de los mayores problemas de salud pública con que se enfrentan muchos países tropicales, especialmente en el sureste asiático. (2,3) En el continente americano, en los últimos años se ha observado el aumento constante de la incidencia de dengue como consecuencia del número de serotipos vírales circulando en la población y el poco control ejercido para la erradicación de los vectores.

La vigilancia epidemiológica, clínica y virológica han fallado como indicadores preventivos en la aparición de las epidemias por dengue hemorrágico, debido principalmente, a la poca atención médica que se les presta a los casos febriles, de

origen desconocido, que preceden al brote mayor. La falta de una evaluación serológica viral en la población, así como el aislamiento e identificación del agente etiológico, causante del cuadro febril, ocasiona que el pasaje silencioso del virus se produzca sin ningún contratiempo; en el caso de haber una población susceptible, una circulación amplia del virus y una densidad óptima de vectores, se tienen las condiciones ideales para que se desarrollarse una epidemia, la cual puede aparecer en pocas semanas o meses.

En el año de 1975, Cuba realizó una encuesta serológica para determinar la presencia del virus dengue y encontró que solamente el 2.6% de la población tenía anticuerpos al grupo viral, sin embargo en 1977 se originó una epidemia por dengue 1, que inmunizó al 44.5% de la población urbana y en 1981 se produjo otra epidemia por dengue 2 que ocasionó el cuadro severo de dengue hemorrágico (4), con una tasa de mortalidad de 0.46 por 1,000. (3)

Los numerosos estudios epidemiológicos efectuados desde 1960 hasta el presente (9,44), han establecido cuales son los factores de riesgo que predisponen para la aparición del cuadro de FHD/SCD, los cuales serían: Inmunidad previa a dengue, edad, sexo, raza y enfermedades crónicas tales como asma, anemia falciforme y diabetes mellitus.

En Guatemala el aparecimiento del dengue es reconocido oficialmente desde 1978, luego de lo cual se presentaron casos esporádicos hasta 1987 en que aparece de nuevo. Según datos de la División de Malaria, entre 1987 a 1991, se había registrado la enfermedad en 15 departamentos, presentando Escuintla, Zacapa y El Progreso el mayor número de casos.

Durante el año de 1992 el Centro de Investigaciones de Ciencia para la Salud y un equipo de investigadores del Sistema Nacional para Erradicación de la Malaria (SNEM) llevaron a cabo una encuesta serológica a nivel nacional, en la cual se evidenció que en la población guatemalteca el 40% de individuos presentan anticuerpos anti dengue, siendo este porcentaje más alto de 50% en algunas poblaciones como Izabal. La presencia de anticuerpos coloca a estas poblaciones en riesgo de desarrollar dengue hemorrágico. (1)

El grado de inmunidad que exista, a uno o varios serotipos virales, determinará la respuesta ante una reinfección y ésta dependerá tanto del tiempo transcurrido entre la infección primaria como del serotipo infectante. Con respecto a la edad, se ha determinado que el grupo etario más susceptible es el de los niños menores de un año, con anticuerpos maternos y que sufren infección primaria.

Los otros grupos etarios de riesgo son los niños de 3-7 años de edad con infección secundaria, que constituyen el grupo más numeroso: los adolescentes o adultos jóvenes con infección secundaria y en muy raras ocasiones, se han reportado en niños y adultos con infecciones primarias. (3)

En cuanto al sexo, se ha observado que es más frecuente en mujeres mayores de 4 años, que en los varones, mientras que por raza, los resultados obtenidos en la epidemia de 1981 en Cuba han demostrado una mayor frecuencia ( $p < 0,01$ ) de la enfermedad en la población blanca en comparación con la de mulatos y negros.

En caso de pacientes con enfermedades crónicas, tales como asma, anemia falciforme y diabetes mellitus, se ha establecido que el número de casos fatales de FHD/SCD en estos grupos son estadísticamente significativos.

## Patogenia.

La patogenesis de los 4 serotipos de dengue ha sido ampliamente estudiada a nivel experimental, con diversos animales y existen numerosos trabajos al respecto, sin embargo, en lo referente a los diferentes mecanismos, que desencadenan el dengue hemorrágico en el humano, quedan muchas incógnitas por despejar, pues aún cuando el dengue clásico es una infección viral irrelevante, que puede hasta pasar desapercibida, la reinfección heterotípica desencadena un cuadro clínico de sumo cuidado.

En base a numerosos estudios seroepidemiológicos se ha logrado determinar que cuando existen 2 ó más serotipos de dengue circulando en el ambiente, ocurre una respuesta inmunológica anormal del huésped. La pregunta clave sería ¿cómo los anticuerpos ejercen su efecto negativo en la evolución de la infección?.

Para dar respuesta a esto, se han conjugado los estudios realizados por numerosos autores para explicar lo que podría ocurrir al producirse una infección primaria o secundaria.

### Infeción primaria:

Durante la infección con un serotipo particular de dengue se llevan a cabo diferentes reacciones en el huésped, que involucran la presencia de anticuerpos y la inmunidad mediada por células (Linfocitos T citotóxicos y linfocitos mediadores de la hipersensibilidad tardía) permiten la recuperación de la infección primaria. Simultáneamente, la infección primaria produce una inmunosupresión temporal que puede dar como resultado disturbios o alteraciones inmuno-reguladoras (por ej: alteración de la relación T-ayudador/T-supresor). Esto conlleva a la formación de anticuerpos no neutralizantes que tienen una acción potenciadora. (4,5)

### Infeción secundaria:

- a) Si la infección ocurre con un serotipo homólogo, la memoria linfocítica del huésped elimina el virus y no se produce la enfermedad.
- b) Si la infección ocurre con un serotipo heterólogo, los anticuerpos no neutralizantes o potenciadores, los cuales están dirigidos hacia epítopes vírales que no bloquean el contacto del virus con la célula a infectar, no producen neutralización y son los que ayudan a promover la replicación del virus dentro de la célula (específicamente monocitos y macrófagos), formando complejos con los receptores Fc en tales células que quedarían compuestos de la siguiente manera: Virus + Ac no neutralizantes + Fc del macrófago/monocito. Estos monocitos infectados con el virus del Dengue, no neutralizado, pueden llevar a cabo dos tareas, las cuales son complementarias y sinérgicas:
  - a. Pueden convertirse en células blanco para su eliminación por la respuesta inmune del activador, liberan una

variedad de factores (linfocinas), los cuales, a través de sus efectos sobre la permeabilidad vascular, el sistema de complemento y proceso de coagulación pueden producir shock y hemorragias.

- Pueden funcionar como células que presentan antígeno en su superficie, a los linfocitos mediadores de la hipersensibilidad tardía. Estos linfocitos activados liberan una variedad de linfocinas que afecta y aumenta la permeabilidad vascular, y otros factores tales como el factor de agregación plaquetaria, el cual induce dicha agregación y activa el sistema de coagulación. (4,5,6)

## Clínica.

Clasificación:

- ) Dengue clásico.
- ) Fiebre del Dengue Hemorrágico y Síndrome de choque.

El cuadro clínico del dengue clásico, que puede ser una infección primaria o secundaria a un mismo serotipo viral, tiene un período de incubación de 5-8 días después de haberse producido la picadura del mosquito y los signos y síntomas varían según el número de exposiciones al virus, la edad, sexo y raza en general en una infección primaria se puede observar fiebre persistente de 39-40°C con una duración de 5-6 días, que ocasionalmente puede ser difásica; fuertes dolores musculares y óseos, altralgias intensas, cefaleas, dolor retroorbital, alteraciones del gusto y linfadenopatías. En los tres días siguientes a la aparición de la fiebre, puede presentarse una erupción generalizada en todo el cuerpo, de tipo maculo - papular, purpúrea o petequial, que comienza en el pecho y tronco

diseñándose a las extremidades y cara, con o sin picazón y ardor, teniendo una duración de 2-3 días.

En algunos casos pueden observarse manifestaciones hemorrágicas de severidad variable como epístaxis, equimosis, sangramiento gíngival, vaginal y gastrointestinal, así como hematuria; lo cual no debe confundirse en ningún momento con el dengue hemorrágico a menos que estén presentes otras alteraciones. Al final del período febril se pueden observar petequias en el dorso de los pies, piernas, manos o dedos, y ocasionalmente en la mucosa oral.

En el caso de ser una reinfección heterotípica, como sucede con el dengue hemorrágico, se produce una brusca elevación de la temperatura que puede durar 5-7 días y disminuir ligeramente, siendo acompañada por diferentes síntomas tales como náuseas y vómitos, dolor abdominal, hepatomegalia, petequias y alteraciones hemorrágicas (hematemesis y melenas) que obligan a la hospitalización y tratamiento del paciente. Según la gravedad del cuadro clínico, la O.M.S., ha propuesto su clasificación en cuatro grados a saber: (4)

**Grado I:** Presenta fiebre con cualquiera de los síntomas antes descritos y prueba de torniquete positiva.

**Grado II:** El cuadro anterior, así como las hemorragias espontáneas, cutáneas y en otras localizaciones.

**Grado III:** Insuficiencia circulatoria con pulso rápido y débil. Disminución de la presión arterial diferencial (20 mm Hg) o hipotensión. Agitación y frialdad de las extremidades.

**Grado IV:** Estado de shock profundo sin detectar pulso y descenso crítico de la presión arterial.

En las pruebas radiológicas se pueden observar derrames pleurales y/o pericárdicos; en la mayoría de los casos el edema cerebral produce alteración de la barrera capilar dando origen al shock.

### Diagnóstico.

El dengue puede ser diagnosticado por procedimiento clínico diferencial y a través de varias pruebas de laboratorio.

El dengue clásico, es por lo general, una infección benigna y puede en algunos casos ser confundido con otras infecciones virales tales como influenza, rubeola y sarampión; y en ciertos países puede confundirse con la fiebre recurrente espiroquetósica.

Los hallazgos de laboratorio más importantes que pueden ayudar al médico para dar un diagnóstico presuntivo de dengue hemorrágico son:

- Trombocitopenia (menos de 100,000 plaquetas por cc3).
- Hemoconcentración (aumento de hematocrito en 20%).
- Leucopenia.
- Leve elevación de la transamina glutámico - oxalacética.

De esta forma se puede diferenciar el dengue clásico del hemorrágico de grado I y II. En la evolución a un cuadro de dengue hemorrágico de grado II y IV, los hallazgos de laboratorio varían de acuerdo al individuo, pero los más importantes son:

- Leve leucopenia en los estadios tempranos de la enfermedad, seguida por una cuenta normal o leucocitosis, principalmente linfo y monocitosis.
- Hemoconcentración.
- Trombocitopenia.
- Hipoalbuminemia.

- Híponatremia.
- Urea y Transaminasas sanguíneas elevadas.

En los casos más severos:

- Tiempo de protrombina alargado.
- Disminución de los niveles de los factores de coagulación II, V, VII, IX y XII.
- Hípo fibrinogenemia.
- Disminución de los componentes del sistema de complemento (C3, C4, C5-8).

### Diagnóstico virológico:

El agente infeccioso puede ser identificado empleando dos procedimientos:

- o) Aislamiento del virus.
- o) Pruebas inmunológicas.

o) **Aislamiento del virus.** Puede efectuarse principalmente a partir de suero, plasma o leucocitos obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad (primeros cinco días). También pueden tomarse biopsias de tejidos y órganos para tratar de aislar el virus; lo más recomendable es hacer una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de antígenos virales en el tejido seleccionado.

El material puede ser inoculado en animales susceptibles (ratones lactantes y/o mosquitos) y cultivos celulares principalmente de células de mosquito (19,68). La presencia del virus es detectada mediante la prueba de inmunofluorescencia directa o indirecta utilizando anticuerpos mono o policlonales. Otras pruebas utilizadas

para identificar el serotipo viral son las de hibridación con sondas de ARN (52) y la determinación de oligonucleóticos distintivos, que han permitido determinar el origen y distribución geográfica de los virus del dengue; sin embargo, su empleo es limitado para diagnóstico en los laboratorios de referencia, que puedan contar con equipo especial para desarrollar estas técnicas.

o) **Pruebas Inmunológicas.** Permiten la detección de anticuerpos IgM, IgG y antígenos virales. Las pruebas más utilizadas son las siguientes:

**ELISA:** Permite detectar anticuerpos IgM o IgG. En el caso de las IgM su presencia indica una infección reciente, bien de tipo primario o secundario, pues los anticuerpos se pueden detectar a partir de los 5 días después de la infección y persisten por 60-90 días.

Es la prueba que más rápidamente permite hacer un diagnóstico presuntivo por dengue. Los anticuerpos IgG, de aparición tardía, también pueden ser detectados con esta prueba.

**INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI):** Permite detectar antígenos virales intracelulares en leucocitos de pacientes en fase aguda, para diagnóstico rápido, pero su sensibilidad es inferior al método de ELISA, por lo que es más empleada con cultivos celulares infectados con los 4 serotipos virales, con el propósito de determinar la presencia de anticuerpos en suero.

**INHIBICION DE LA HEMAAGLUTINACION:** Es la prueba más antigua para detectar anticuerpos y antígenos virales y de bajo costo que facilita su utilización en la mayoría de los laboratorios para realizar estudios seroepidemiológicos en gran escala: sin embargo ha sido desplazada por las pruebas descritas con anterioridad.

Al mismo tiempo se planteo como objetivo efectuar antígeno de virus dengue, montar el Método de Elisa para captura de IgM, cultivo viral en células y serotipificación por inmunofluorescencia en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Médicas.

Durante los meses de junio a octubre se analizaron 123 sueros, de estos el 20.32% fue positivo para dengue, aislándose 3 de los 4 serotipos; : D1, D2 y D4.

## OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar en el Laboratorio Multidisciplinario la capacidad de efectuar inmuno diagnóstico de Dengue, cultivar virus Dengue y serotipificarlo.
- Desarrollar en el Laboratorio Multidisciplinario la capacidad de hacer el antígeno viral tanto a partir de cultivo en ratón como en células, para obtener materia prima para el diagnóstico.
- Conocer la sintomatología predominante en los pacientes que cursan con Dengue en la ciudad capital.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar anticuerpos I g M por el Método de Elisa, en pacientes con cuadro clínico de dengue.
- Determinar anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en pacientes con cuadro clínico de dengue.
- Efectuar cultivo viral en células C6 36, de los sueros de pacientes enfermos.
- Serotipificar los virus aislados en cultivo por el Método de Inmunofluoresencia.
- Efectuar cultivo de virus dengue en cerebro de ratón lactante para extraer antígeno.
- Caracterizar clínicamente el comportamiento del dengue en estos pacientes.

## JUSTIFICACION

Dada la alta incidencia de dengue en nuestro país y el área centroamericana, y el alto riesgo de epidemias de dengue hemorrágico, es necesario que se capaciten los laboratorios para efectuar el diagnóstico de esta enfermedad.

Siendo el Laboratorio Multidisciplinario un centro de referencia diagnóstica para las clínicas familiares y para las áreas de trabajo de estudiantes de Ejercicio Profesional Supervisado, tanto rural como hospitalario, es necesario e imperativo que se capacite a este centro en el adecuado diagnóstico inmunológico y virológico del Dengue; al mismo tiempo es importante iniciar a producir nuestros propios reactivos para el diagnóstico, comenzando por el antígeno. Es importante también, conocer cómo se comporta clínicamente el dengue en esta población.

## METODOLOGIA Y TECNICAS DE LA INVESTIGACION

Se recolectaron muestras de pacientes que consultaron a las Clínicas Familiares de la Facultad de Ciencias Médicas y al Laboratorio de Inmuno diagnóstico de la D.G.S.S.

Con asesoría técnica de la Organización Panamericana de la Salud, a través de la Dra. Guadalupe Guzmán del Instituto Pedro Kourí de La Habana, Cuba, se montaron las técnicas de Inhibición de la Hemaglutinación, Mac. Elisa, Cultivo viral en células C6 36 y serotipificación por inmunofluorescencia; además obtención de antígeno por el Método Sacarosa - Acetona-

El personal que participó en la recolección de datos es el personal de las clínicas periféricas familiares de la Facultad de Ciencias Médicas y personal del Laboratorio de Inmunodiagnóstico de la D.G.S.S.

El personal de salud involucrado en esta investigación, previa entrevista, procedió a extraer 10ml. de sangre total la cual se transfirió a tubos estériles libres de aditivos o preservativos. Los tubos conteniendo sangre se colocaron lo más rápido posible en hielo o en el refrigerador (-4°C) para asegurar las óptimas condiciones durante el aislamiento, la separación del suero del coagulo se realizó el mismo día de la toma de la muestra y en condiciones asépticas.

Los tubos con el suero se congelaron y almacenaron a temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-70^{\circ}\text{C}$ . El suero se envió lo antes posible al laboratorio realizando el transporte en cadena de frío.

Los pacientes que pudieron asistir al laboratorio multidisciplinario, fueron atendidos por la coordinadora del proyecto quien los entrevistó y extrajo la muestra.

#### Técnicas utilizadas:

- entrevista directa
- inhibición de la hemaglutinación
- MAC - ELISA
- Cultivo de virus dengue

Para la extracción de los antígenos se utilizó la técnica de sacarosa-acetona (Clarke y Casals, 1958) y la técnica de cultivo de tejidos (Células C6 36)

## RESULTADOS

Se obtuvo 121 sueros de los cuales el 20.32% presentaron anticuerpos IgM antídengue, de estos en el 60% se aisló el virus, encontrando que en la población circulan 3 de los 4 serotipos. D1 5.88%, D2 38.23% y D4 17.64%.

Se efectuó cultivo del virus Dengue, en cerebro de ratón lactante para efectuar antígeno. Logramos cultivar Dengue 1 y Dengue 2, obteniendo para Dengue 1 una titulación de 1/64 y para Dengue 2 una titulación de 1/256. Este antígeno se encuentra en alícuotas almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se procesó por el Método Sacarosa - Acetona. (2). (Se adjunta vídeo tape de todo el proceso).

Se obtuvo también antígeno a partir del cultivo en células C6 36, una línea celular traída específicamente al laboratorio desde el I.P.K. de la Habana, a la cual se le ha dado mantenimiento hasta ahora y se continuará para el futuro.

En el aspecto clínico se encontró:

- 74.28% de los pacientes presentaron rash;
- 100% fiebre continua;
- 100% cefaleas;
- 100% mialgia;
- 100% artralgia;
- 60% manifestó nauseas;
- 40% vómitos sin sangre;
- 5.7% prueba de lazo positiva.

El recuento de plaquetas y Hb y Ht fueron normales en el 100% de los casos. No se presentó ningún caso de dengue hemorrágico, aunque dengue clásico con petequias en mucosa oral y hemorragias de encías se encontró en un 8.57% .

No se observaron manifestaciones neurológicas.

Nos tropezamos con varias dificultades, una de ellas, fue la difícil comunicación con el Instituto Pedro Kourí, de La Habana - Cuba, lo cual ocasionó problemas administrativos y el atraso en la recepción de los reactivos para el trabajo.

Otro problema fue la afluencia de pacientes a las clínicas familiares y al laboratorio multidisciplinario, que según datos epidemiológicos de 1,995, esperábamos que fuera mayor; sin embargo y probablemente por las campañas de educación que llevó a cabo el MINSAP y la Facultad de Ciencias Médicas, el número de casos de dengue disminuyó notablemente en 1,996.

En consulta a las clínicas o al laboratorio, tuvimos 46 pacientes a quienes se les investigó el cuadro clínico, procedencia, datos de laboratorio, anticuerpos y cultivo, para lo cual se diseñó una boleta. ( Se adjunta una muestra a este informe).

Sin embargo queriendo elevar el número de casos, la licenciada Leticia Castillo, Coordinadora del laboratorio de Inmunodiagnóstico de la Dirección General de Servicios de Salud, con la anuencia del Centro de Investigaciones de Ciencias Para la Salud (CICS); llevó al laboratorio multidisciplinario, la cantidad de 77 sueros de pacientes febriles que acudieron en demanda de servicio diagnóstico al SNEM, durante el período

comprendido del 01 de septiembre al 31 de octubre de 1996, obteniéndose así un total de 123 sueros de mayo a octubre.

Se empezó a procesar sueros a partir de mayo, no contábamos con reactivos de Elisa, por lo tanto iniciamos con I.H y cultivo.

Algunos sueros los almacenamos y luego los procesamos en agosto con Mack Elisa. Algunos sueros, la cantidad obtenida no permitía guardar para posterior análisis.

La ficha clínica analizada fue llenada por el médico tratante, pues en muchas ocasiones el paciente no podía acudir al Laboratorio Multidisciplinario y se enviaba la muestra más la ficha. Cuando el paciente llegaba al laboratorio la ficha la llenaba la médica coordinadora del proyecto.

A través de los fondos de DIGI, obtuvimos reactivos para Elisa, a través de la Organización Mundial para la Salud, O.P.S., y el Instituto Pedro Kourí de la Habana, Cuba. Con la experta asesora para Latinoamérica, Dra. Guadalupe Guzmán, se montó la técnica de cultivo viral en células C6 36 y la identificación de serotipo por inmunofluorescencia. Las células fueron donadas especialmente para el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Médicas; son una clona especial de células de estómago de mosquito Aedes Albopictus, adaptadas a crecer a una temperatura de 33°C (donación de O.P.S.); con fondos de DIGI se obtuvo anticuerpos monoclonales y conjugados fluorescentes.

## Técnicas utilizadas:

### Línea celular C6/36:

La línea celular es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya, aunque en estudios realizados recientemente (Kuno, 1985) se ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos tales como la AP61 y las TRA-284.

Aunque algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático (ECP) de tipo sincitial en las C636, este fenómeno no es característico de la línea. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados.

### Medios y materiales:

Medio de Crecimiento para 100ml.

MEM (Earle) 10 X	10ml.
STF (inactivado)	10ml.
Solución 100X aminoácidos no Esenciales.	2ml.
Glutamina 200mM	1ml.

Completar a 100ml. Con agua bidestilada y ajustar el pH a 7,2-7,4. De las firmas comerciales Gibco y Flow puede obtenerse el medio MEM Earle con aminoácidos no esenciales y glutamina, al que sólo es necesario añadir STF.

Pipetas de 5-10ml. Con la punta doblada en ángulo de 90° o políaca de goma.

### Siembra de las células.

- Decantar el medio de un frasco Roux con monocapa confluyente.
- Desprender las células en 10ml. De medio de crecimiento de forma tal que el medio caiga perpendicular a la monocapa celular o desprender la superficie con un políaca de goma.
- Añadir 1ml. De suspensión celular a cada Roux que contenga de 100-120ml. De medio de crecimiento (split 1:10 semanal)  $8 \times 10^8$  células/ml incubar a 28°C. La monocapa estará completa en 4-5 días.
- Sí fuera necesario realizar la inoculación a los tres días de sembradas las células, debe aumentarse la concentración a  $2-3 \times 10^8$  células/ml utilizando para ello una razón de pase de 1:5-1:6. El medio que se emplea para mantener las células después de inoculadas es el medio de crecimiento de la línea, sólo es necesario suplementarlo con 2% STF.

## Preparación de antígeno por el método de sacarosa-acetona.

Aunque existen varios métodos para la preparación de antígenos para arbovirus, la técnica más utilizada es la extracción con sacarosa-acetona descrita por Clarke y Casals en 1958 la cual proporciona antígenos estables con altos títulos.

El proceso es potencialmente peligroso y deben tomarse las medidas necesarias para la manipulación del virus infeccioso, de la acetona (inflamable) y de la sustancia inactivadora del virus (carcinogénica).

Este método rinde antígenos hemaglutinantes y fijadores del complemento por lo que pueden utilizarse para ambas técnicas.

La acetona permite un mayor rendimiento viral al actuar sobre los lípidos del cerebro. La sacarosa protege de la acción de la acetona sobre la envoltura del virus mediante un mecanismo que aun no ha sido dilucidado por completo. La relación entre las concentraciones de sacarosa, cerebro, acetona y agua parecen ser críticas en el rendimiento viral.

### Materiales y equipos:

- Gabinete de seguridad.
- Centrifuga refrigerada.
- Homogenizador mecánico o eléctrico.
- Cristalería.

### Reactivos:

- Sacarosa.
- Aceitona, calidad reactiva a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Solución Borato Salina pH 9 (BS).
- Tris (Hydroxymethyl aminomethane, Gibco 130910)
- Beta propiolactona (BPL) (Betaprone, Fellows Testagar, Detroit, Michigan)
- Alcohol 70%

### Obtención de cerebros de ratones infectados.

- Inocular por vía intracerebral los ratones lactantes de 1-2 días de nacidos con 0,02ml. de una suspensión de cerebro de ratón infectado. Esta suspensión usualmente se prepara a una dilución 1/50 del cerebro en PBS con 5% de suero de ternera inactivado por calor y antibióticos. Puede usarse en lugar de PBS, medio 199 u otro.
- Examinar los ratones inoculados al menos dos veces al día en búsqueda de los signos de la enfermedad. Cuando la

- mayoría de los ratones esten enfermos deben congelarse preferiblemente a  $-20^{\circ}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- Los ratones se desinfectan con alcohol al  $70^{\circ}$  y se dejan secar. El tejido cerebral de cada ratón se extrae asepticamente por aspiración colocándolo en un frasco con hielo.
- Para preparar el antígeno pueden utilizarse los cerebros previamente extraídos y guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  o pueden guardarse los ratones a  $-20^{\circ}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día antes de la preparación del antígeno momento en el cual se dejan durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  para su descongelación y posterior extracción del cerebro.

### Extracción del antígeno.

El antígeno se prepara asepticamente en un gabinete de seguridad grado 2 preferiblemente. Tanto el antígeno como la acetona son infecciosas por lo que deben manipularse con extremo cuidado. Debe evitarse el uso de mecheros durante el proceso.

- Por cada volumen de cerebro de ratón extraído añadir 4 volúmenes de sacarosa al 8,5% en agua destilada. Homogenizar la suspensión exhaustivamente en frío.
- Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría (kitasato). utilizar para esto una aguja #18 larga sumergida en la acetona.
- Agitar vigorosamente en ambos sentidos y dejar reposar en baño de hielo durante 15 minutos.
- Aspirar la acetona completamente y añadir otros 20 volúmenes de acetona fría.

Previamente romper el precipitado con un agitador de vidrio. Dejar sedimentar el antígeno y reposar en baño de hielo durante 1,5 horas con agitación ocasional durante la primera hora.

- Aspirar la acetona y secar el precipitado utilizando una bomba de alto vacío (10 mB) hasta la aparición de un polvo rosado claro (aproximadamente 30 min.)
- Rehidratar con buffer tris-borato salina + 0.5 volúmenes del homogenizado de cerebro-sacarosa (el tris se prepara al 1 molar en cloruro de sodio al 0,85% y posteriormente se lleva a 0,1 M en buffer borato-salina pH 9 chequeándose este posteriormente).
- Dejar rehidratado toda la noche a 4°C con agitación.
- Centrifugar 30 minutos a 4°C a 3000rpm y desechar el precipitado.
- Para inactivar el antígeno se añade BPL (1% en borato salina pH 9) para una concentración final de 0,1%. Agitar bien y mantener a 4°C durante 24 horas.
- Distribuir en alícuotas para guardar a -70°C o para liofilizar y guardar a -20°C.
- Chequear si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactantes y observar por 21 días.
- Para los virus Dengue la concentración de BPL de 0,1% es crítica ya que concentraciones mayores reducen la actividad del antígeno.
- Durante el proceso de extracción deben reenvasarse varias ampulas conteniendo cerebro de ratón en suspensión al 10% (en PBS o medio de cultivo + suero de ternera al 5% + antibióticos) las cuales se guardarán a -70°C y servirán como

virus "semilla" para el próximo pase en ratones y de esta forma mantener el virus.

### Inhibición de la hemaglutinación.

- Rotular las placas con el número de los sueros a probar y el antígeno a utilizar. Es recomendable usar una placa por antígeno. Los sueros son probados utilizando 4, 8 ó 12 diluciones de los mismos contra el antígeno; dependiendo esto del tipo de suero, del propósito y de la experiencia del laboratorio en el diagnóstico o encuestas serológicas. Los pares de suero de un paciente deben ser tratados y probados en el mismo ensayo.
- Añadir 0,025ml. de BABS a cada pozuelo.
- Añadir 0,025ml. del suero a titular en el primer pozuelo de cada hileras.
- Diluir los sueros con las asas dilutoras o pipetas automáticas "multicanal".
- Añadir a cada pozuelo 0,025ml. de la dilución de antígeno que contiene 8 unidades hemaglutinantes.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Añadir 0,05ml. de glóbulos rojos diluidos en el pH óptimo para el virus.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Lectura:

La inhibición de la hemaglutinación presenta un patrón de no hemaglutinación. El título inhibidor de la hemaglutinación es la mayor dilución de cada suero que produce inhibición de la hemaglutinación completa o casi completa y se expresa como la dilución del suero. Ejemplo 1:160. Como el patrón de aglutinación puede cambiar con el tiempo, el punto final puede ser marcado sobre la placa con un plumón tan pronto como se forme.

Controles.

- Control de glóbulos rojos de ganso (permite detectar aglutinación inespecífica de las células en ausencia de suero y antígeno); solo contiene BABS y glóbulos rojos.
- Control de suero positivo o líquido ascítico hiperinmune con anticuerpos al antígeno utilizado.
- Control de suero negativo al antígeno utilizado.
- Control de células para cada suero para detectar aglutinación no específica (sólo contiene una dilución baja de suero 1:10 ó 1:20 y glóbulos rojos).
- Control de las unidades hemaglutinantes del antígeno.

Procedimiento para la IF Indirecta.

- Sobre la muestra se añade el antisuero específico en dilución apropiada y en cantidad suficiente para cubrirla por completo. El antisuero específico puede ser líquidos acíticos

hiperímmunes de preferencia, sueros hiperímmunes, sueros de pacientes, anticuerpos monoclonales y otros en dependencia del objetivo de la experiencia. Las láminas se mantienen a 37°C durante 30 mín. en cámara húmeda.

- Posteriormente se colocan en los vasos koplín. Se añade PBS que se elimina al instante. Se agrega nuevamente PBS y se agita suavemente 15 segundos, se elimina el PBS y de esta misma forma se realiza otro lavado hasta un total de tres.
- Se extraen las láminas de los vasos koplín se secan cuidadosamente por la cara posterior a donde están las muestras y sobre ellas se añade el conjugado comercial que ha sido previamente titulado y determinado la dilución de trabajo. Esta dilución se prepara utilizando PBS + Azul de Evans, que servirá de contraste.
- Las muestras se mantienen en contacto con el conjugado durante 30 mín. A 37°C en cámara húmeda.
- Después de lavadas, las láminas se secan por detrás y encima de las muestras se añade una pequeña cantidad de glicerina bufferada (9 volúmenes de glicerina + 1 volumen de PBS). Sobre la glicerina se coloca cuidadosamente el cubreobjeto con un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie de forma tal que no forme burbujas que dificultan grandemente la observación al microscopio.
- Se observan las láminas bajo un microscopio para fluorescencia y se valoran las muestras positivas y negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles que deben incluirse en cada experiencia. La IF específica, en este caso, se describe como citoplasmática perinuclear.

## "Kit Diagnóstico": Dengue\* IgM.

El "Kit Diagnóstico Dengue\* IgM se conformó para realizar un total de 180 determinaciones, ya sea en placas completas o en grupos de 4 tiras desmontables, siendo los componentes del sistema los siguientes:

- 2 Placas de poliestireno sensibilizadas con anti-IgM.
- 1 Frasco de diluyente de muestra 25 X (3ml).
- 2 Frascos de control de positivo (1mlc/u) y 2 de negativo (1.5 mlc/u listos para usar).
- 1 Frasco de solución de lavado 25 X (100ml).
- 1 Frasco de suero humano negativo (2ml.).
- 6 Frascos de antígeno inactivado liofilizado conteniendo los 4 serotipos (2ml c/u).
- 6 Frascos de conjugado prediluido (2ml c/u).
- 6 Frascos de sustrato liofilizado (5ml c/u).
- 1 Frasco de peróxido de hidrógeno (500ul).

El antígeno de dengue, los controles positivos y negativos y el suero humano negativo (SHN) se encuentran inactivados. Los controles y el suero humano negativo son no reactivos para los virus VIH 1 y 2, y para HBAGs. No obstante deben manejarse con precaución.

### Procedimiento.

0. Retirar del estuche las placas o tiras a utilizar según el número de muestras a procesar. Se recomienda confeccionar

un esquema de trabajo identificando correctamente la posición de cada muestra y los controles.

0. Dispensar 50ul. del diluyente de muestra 1x en todos los pocillos con excepción de los pocillos para los controles positivos y negativos. Añada entonces siguiendo el esquema de distribución 2,5ul. de cada suero, agitando ligeramente la placa para homogenizar la dilución. Se recomienda utilizar no menos de 2 pocillos para el control positivo y 4 para el negativo.
0. Incubar en cámara húmeda 2 horas a temperatura ambiente.
0. Lavar la placa 5 veces con la solución de lavado 1x, utilizando un volumen de 250-300ul por pozo. Si se dispone de lavador automático seguir similar procedimiento. Secar la placa invirtiéndola sobre papel de filtro.
0. Dispensar 50 ul de antígeno por pozo, reconstituido previamente con 2ml de solución de lavado conteniendo SHN al 5%. Incubar a 4°C durante toda la noche.
0. Lavar 5 veces con solución de lavado como en el punto 4.
0. Dispensar 50 ul por pozo del conjugado previamente diluido con 2ml de solución de lavado conteniendo SHN al 5%. Incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
0. Lavar 7 veces con solución de lavado como en el punto 4.
0. Añadir 100 ul del sustrato reconstituido previamente con 5ml de agua destilada, adicionando 2 ul de peróxido de hidrógeno. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
0. Detener la reacción adicionando 100ul por pozo de la solución de ácido sulfúrico al 12,5% en el mismo sentido en que se añadió el sustrato.

o. Realizar la lectura de la densidad óptica utilizando un filtro de 492nm y ajustando blanco con el aire.

Cálculo de los resultados.

o. Calcular la media de la densidad óptica de los controles negativos ( $X_n$ ).

o. Calcular la media de la densidad óptica de los controles positivos ( $X_p$ ).

validez de la prueba:  $X_p \geq 5X_n$ ; valor límite =  $2X_n$ .

El valor de corte se establece en función de la media del control negativo considerando como positivos aquellos sueros que presenten un valor de densidad óptica mayor o igual a dos veces la media del negativo. La validez del sistema se establece por la relación de la media de los positivos y los negativos la cual debe ser igual o mayor de 5.

**IMPORTANTE:** un resultado negativo a la presencia de IGM contra dengue no excluye la posibilidad de exposición anterior a este virus por lo que en caso de síntomas clínicos compatibles, se recomienda probar una nueva muestra varios días después.

## ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

A través de esta investigación se desarrolló plenamente la capacidad diagnóstica de Dengue a través de pruebas inmunológicas y de cultivo viral.

Definimos como capacidad diagnóstica de Dengue a la posibilidad de obtener anticuerpos antidengue y obtener virus a partir de sueros de pacientes enfermos, utilizando métodos y técnicas aceptadas por la O.M.S., debidamente estandarizados.

En la actualidad, tanto el señor Decano de la Facultad Dr. Axel Oliva, como el Dr. Jacobo Finkelman, representante de O.P.S., conocen de nuestra capacidad de trabajo. Siendo así que en la estructuración del Laboratorio Central de Referencia, por el Ministerio de Salud Pública se incluyó al Laboratorio Multidisciplinario como centro de referencia a nivel nacional para el diagnóstico de dengue (adjunto copia del documento). Hemos estado colaborando con la Dirección General de Servicios de Salud en capacitación de personal para el diagnóstico de dengue y hemos suministrado insumos (en calidad de préstamo), para el inmunodiagnóstico (adjunto copia de cartas).

El señor Decano, ha sostenido pláticas y ha intercambiado cartas con el Dr. Jacobo Finkelman insistiendo en que un instituto regional de diagnóstico (Cuba, Puerto Rico o Panamá) efectúe pruebas de proeficiencia en el Laboratorio Multidisciplinario.

Estas pruebas se constituyen en control de calidad y en una certificación más de capacidad de trabajo del Laboratorio Multidisciplinario; estas pruebas según el boletín epidemiológico de la O.P.S., de julio de 1997, han sido aplicadas a varios países, siendo estos:

### Pruebas de proficiencia serológica para el dengue

Institución	País
-Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maízteguí	Argentina
-Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP)	Bolivia
-Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia	Colombia
-Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza En Nutrición y Salud (INCIENSA)	Costa Rica
-Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez	Ecuador
-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE)	México
-Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR)	Nicaragua
-Centro Conmemorativo Gorgas de Investigación e Información en Salud	Panamá
-Instituto Nacional de Salud	Perú
-Laboratorio Nacional de Salud Pública Dr. Defilló	Rep. Dominic.
-Caribbean Epidemiology Centre (CAREC)	Trinidad y Tobago
-Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación Del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV)	Venezuela

Como mencionamos con anterioridad, las pruebas que se utilizaron en el diagnóstico incluyen:

- inhibición de la hemaglutinación,
- Mack Elisa
- Cultivo
- Serotipificación viral.

Cuando un laboratorio quiere investigar el cuadro de dengue en su fase aguda, lo más adecuado es determinar inmunoglobulina M pues esta se inicia a elevar durante la primera semana de la enfermedad, y permanecerá elevada hasta los 3 meses, momento en que comienza a descender; esta circunstancia es en términos generales; en algunas personas puede variar tanto el tiempo de inicio de la formación de anticuerpos IGM, como el descenso de las mismas. Es por esta razón que lo más recomendado para efectuar el diagnóstico es el método de captura de IGM a través de Elisa.

En condiciones limitadas (cuando no se cuenta con reactivos de Elisa, como fue nuestro caso hasta mediados del mes de agosto) se debe utilizar el método de inhibición de la hemaglutinación. La desventaja de este método es que no es específico para IGM, sino que toma también la IgG que pudiera haber en el suero del paciente, si este hubiera padecido dengue, por cualquier serotipo, con anterioridad, o cualquier otra enfermedad cuyo agente infeccioso sea un flavivirus (fiebre amarilla, encefalitis equina venezolana, etc.)

Aquí en Guatemala asumimos que no circulan otros flavivirus por lo tanto deducimos que los anticuerpos positivos

para la inhibición de la hemaglutinación (I.H.) son anti dengue, (actualmente, con la epidemia en Chile de virus Hanta, también pudiera haber reacciones cruzadas, si el virus llegara a nuestro país).

Para poder determinar con I.H., que lo que estamos midiendo es IGM, deberíamos de efectuar dos determinaciones, una inicial y otra a las 2 semanas; sin embargo en nuestro medio y dado el cuadro clínico de la enfermedad es muy difícil, que un paciente llegue a sacarse sangre cuando tiene fiebre y regrese cuando ya no tiene ningún síntoma; por lo tanto debe analizarse clínicamente, epidemiológicamente y serológicamente el caso para hacer diagnóstico.

En el caso del cultivo viral, éste debe ser positivo durante el período de viremia en el paciente. Este período es durante los 5 primeros días de enfermedad; es por esta razón que no en todos los pacientes puede determinarse la presencia del virus, ni efectuar serotipificación pues si el paciente tiene más de 5 días de malestar general y fiebre, es muy probable que el cultivo sea negativo. Es por esto que en las comunidades es importante la vigilancia epidemiológica para tomar a los pacientes durante los primeros días de enfermedad y así poder saber qué virus está circulando.

En esta investigación se tomó a los pacientes que tuvieran signos y síntomas de la enfermedad, sin importar el tiempo de duración de los síntomas, pues se determinarían anticuerpos y el cultivo si fuera todavía pertinente.

En algunas ocasiones, durante el período de viremia, los anticuerpos de la clase IGM todavía no han alcanzado niveles que puedan ser detectados por el método de Elisa de captura, por lo tanto podemos tener cultivos positivos y Elisa o I.H. negativos; por lo anterior el criterio de diagnóstico NO son las 3 pruebas positivas juntas, sino una sola más criterios clínicos y epidemiológicos. Eso va a depender de la capacidad instalada de cada laboratorio.

Lo ideal es contar con un laboratorio con el método de Elisa de captura, cultivo viral y determinación de serotipos a través de inmunofluorescencia y anticuerpos monoclonales. Todo esto lo tenemos en el Laboratorio Multidisciplinario.

Se analizaron únicamente los resultados en los casos positivos, los cuales fueron un total de 35; un 20.32%. Hubiera sido deseable poder analizar el tiempo de evolución de la enfermedad con el cuadro clínico, pero desafortunadamente por la forma como fueron llenadas las boletas no es posible hacerlo ya que en la mayoría de los casos las fechas no aparecen; probablemente el paciente no puede dar ese dato.

También pudimos observar que aparece que todos los síntomas se inician el día de consulta, lo cual no es posible.

Durante los primeros meses de la investigación, no poseíamos todavía los reactivos necesarios para la determinación de I g M, por lo que iniciamos con inhibidores de la hemaglutinación y cultivo viral; estos dos métodos con material

que la doctora Guadalupe Guzmán nos brindara procedentes del Instituto Pedro Kourí.

A finales del mes de agosto cuando ya obtuvimos los reactivos para Mack Elisa, procedimos a realizar los tres métodos. No siempre pudo coincidir el resultado positivo en los tres, pero el diagnóstico se efectuó por uno o dos métodos (ver cuadro No.1).

Es interesante encontrar una titulación de inhibición de la hemaglutinación mayor de 1/2500, lo que nos hace pensar en una respuesta elevada de tipo I g G, como si se tratara de una segunda infección(2), aislándose virus D2 y Mak Elisa positivo, pero, analizando clínicamente no presentaba ningún signo de dengue hemorrágico.

Es muy importante hacer notar que el virus que más se aisló fue el D2, provenientes especialmente de Mixco, San Cristóbal y zona 12. Del virus D4, 6 casos provenientes de la zona 7 y 2 casos de D1 procedentes de la zona 6 capitalina.

Al respecto de la edad y el sexo, como en estudios anteriores (ver cuadro No.2), se observó más en el sexo femenino, y en el caso de esta investigación entre las edades de 16 a 20 años, pero sin mayor significancia en la distribución de los casos.

Todos los pacientes con diagnóstico de laboratorio positivo, tuvieron diagnóstico presuntivo de dengue. El 100% presentó dolor de cuerpo, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos. Lo que ya es

conocido. El rash se presentó en el 74.28%, náuseas el 60%, vómitos el 40%; es curioso encontrar diarrea en 14.28% signos hemorrágicos leves en un 8.57%, sin evidencias de laboratorio de hemoconcentración ni trombocitopenia. Ningún paciente presentó cuadros neurológicos.

La sintomatología no guarda relación con el serotipo viral. (cuadro No.3; gráfica No. 3, 4 y 5)

Al respecto de otras pruebas de laboratorio, encontramos 2 pruebas de lazo positivos, con plaquetas y relación Hb - Ht normal. (cuadro No.4; gráfica No.6)

Todos los pacientes tuvieron hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas normales.

Al preguntar a los pacientes de la posibilidad de haber viajado con anterioridad al interior del país, al cuadro clínico solamente 7, 20%, respondieron que sí, 4, 11.42% a la Costa Sur y 3, 8.57% a Puerto Barrios. La mayoría de casos son entonces originarios de la capital y muy pocos probablemente llegaron de la Costa Sur y la región oriental del país. Curiosamente el D2, tiene relación con viaje a las regiones antes mencionadas.

Nadie refirió haber presentado dengue con anterioridad. (gráfica No.7)

## CONCLUSIONES

- De los sueros de 123 pacientes residentes en el área metropolitana, se efectuó diagnóstico de dengue en el 20.32% de los casos.
- El sexo más afectado por la enfermedad continúa siendo el femenino. La edad en este estudio no es significativa.
- Se aisló dengue D1, Dengue 2 y Dengue 4 de los sueros de los pacientes estudiados.
- El cuadro clínico presentado por los pacientes, no guarda relación con el serotipo viral aislado.
- Los pacientes que presentaron infección por Dengue 2, tuvieron como antecedentes viaje a la Costa Sur o a la región oriental del País.
- El cuadro clínico se caracterizó por presentar los siguientes signos y síntomas: rash máculo papular (74.28%), fiebre continua, cefálea, mialgias y artialgias (100%), náuseas (60%), vómito sin sangre (40%), prueba de lazo positiva (5.71%), petequias y hemorragias leves (8.57%) de los casos.

- No encontramos ningún caso de dengue hemorrágico.
- Ningún paciente refirió haber sufrido dengue con anterioridad.
- Efectuar el antígeno de dengue, es un procedimiento sencillo para el cual tenemos infraestructura, tanto para antígeno en cerebro de ratón como en células C6 36.
- A través de esta investigación se logró que el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC, cuente con el recurso humano y la infraestructura necesaria para efectuar el diagnóstico inmunológico y virológico de Dengue.

## LOGROS DE LA INVESTIGACION

- Se implementó, estandarizó y normatizó en el Laboratorio Multidisciplinario el Diagnóstico de Dengue por Métodos Inmunológicos y Viroológicos.
- Se tiene en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Medicina de la USAC, la línea celular C6 36 para el cultivo viral, y la capacidad técnica para hacerlo.
- Se cuenta con infraestructura y capacidad técnica para la serotipificación del virus.
- Se elaboró antígeno de Dengue y se cuenta con infraestructura y capacidad para continuar produciéndolo.
- Se identificaron los principales signos y síntomas clínicos que se observaron en los pacientes que consultaron con Diagnóstico de Dengue.
- Identificamos un método para diagnóstico rápido de anticuerpos por inmuno fluorescencia, el cual debemos todavía estandarizar.

- Se tiene ofrecimiento por parte de la Dra. Guadalupe Guzmán, de que el I.P.K., pase una prueba de proeficiencia a este laboratorio si la Organización Panamericana de la Salud está

anuyente. Se tiene reconocimiento como Centro de Referencia Nacional.

Hemos recibido en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Médicas, la propuesta para coordinar con el MINSAP, el diagnóstico de Dengue a nivel nacional, lo que se haría en forma de docencia productiva; proyecto que fue presentado a la Junta Directiva de esta Facultad, la cual dictaminó favorablemente. Se encuentra actualmente a nivel del Honorable Consejo Superior Universitario de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el Inmuno-diagnóstico del Dengue en este laboratorio.
- Continuar con el cultivo viral.
- Continuar obteniendo antígeno viral.
- Continuar investigaciones para poder efectuar diagnóstico rápido con Inmunofluorescencia, a partir de nuestro antígeno.
- Dar seguimiento con O.P.S., para efectuar prueba de proeficiencia.
- Dar seguimiento al proyecto para la venta de servicios al Ministerio de Salud Pública y entidades privadas. (Docencia Productiva).

## INDICE

Marco Teórico

Justificación

Objetivos generales

Objetivos específicos

Metodología y técnicas de la investigación

Resultados

Cuadros y gráficas

Análisis y discusión de resultados

Conclusiones

Logros de la investigación

Recomendaciones

Bibliografía

## Apéndice

### BIBLIOGRAFIA

0. De Mata F. Y Cols. Seroepidemiología del Dengue en Guatemala. Cícs. Vd. 4 No.1. 1993.
0. Instituto Pedro Kourí. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue. Documento. Ciudad de la Habana, Cuba. 1991.
0. Martínez E. Dengue hemorrágico en niños. Cuba. 1990.
0. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. Guías para la prevención y control del dengue. En revisión. Enero, 1995. OPM/OMS.
0. Dengue Haemorrhagic Fever. Diagnósis treatme y control. World health organization. Geneva. 1986.
0. Función fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares neutrofilos (PMN) en pacientes con fiebre hemorrágica por dengue (FHD). Lic. René A. Rivero. Dr. Jesús Gómez Arbesu. Tec. Lourdes Palma y Dr. José Ballester Sontovenía. Instituto de hematología e inmunología.

- 0. Resúmenes del XII Congreso Latinoamericano de Microbiología. La Habana Cuba.
- 0. Entrevista con la doctora Guadalupe Guzmán. Viróloga. Consultora para O.P.S en aspectos de diagnóstico de Dengue.
- 0. Boletín epidemiológico. O.P.S. Vol.18. No. 2. 1997.

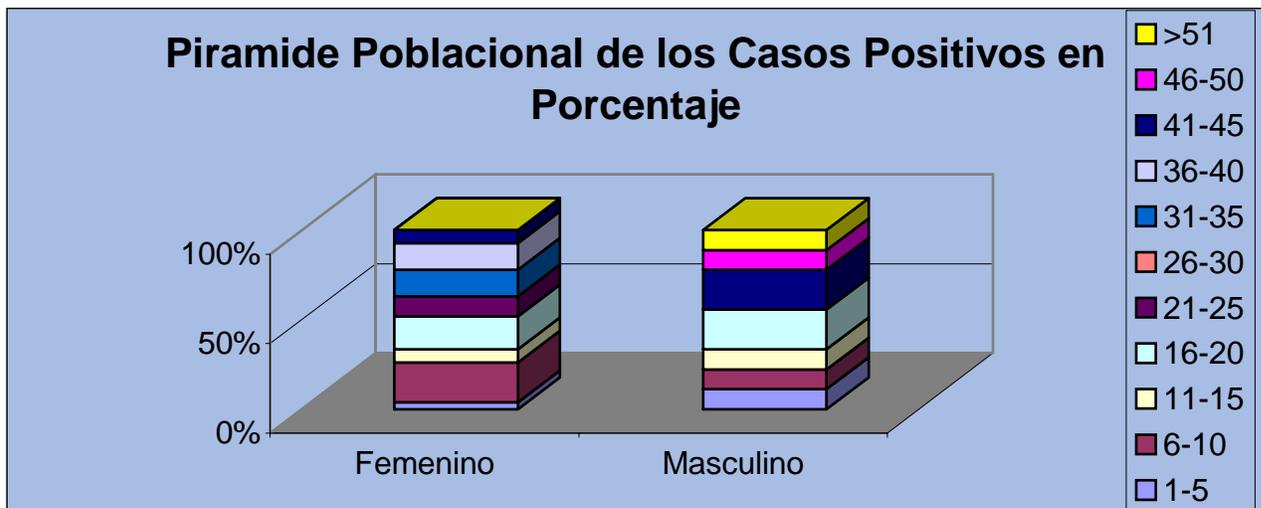
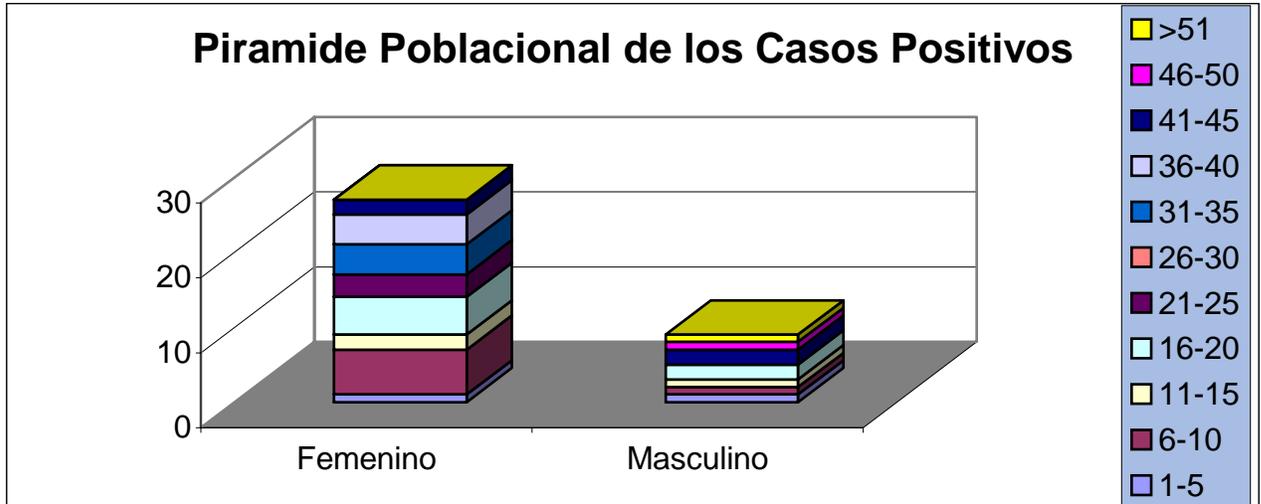
## APÉNDICE

Cuadro No 2

*Casos Positivos de Dengue por Edades y Sexo*

<b>Edades</b>	<b>Femenino</b>	<b>Masculino</b>
1-5	1	1
6-10	5	1
11-15	2	1
16-20	5	2
21-25	3	0
26-30	0	0
31-35	4	0
36-40	4	0
41-45	2	2
46-50	0	1
>51	0	1
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>9</b>

Grafica No 2



Casos	Positivos
No 2	cultivo + Den 1 / No / No
No 4	Elisa IgM + / -
No 8	Elisa Tgm + / No / No /
No 9	IH 1/10 + / No / No
No 10	IH 1/10 + / Eligr IGM+/ Cultivo Dengue 2
No 11	Cultivo + D4 / No / No
No 12	IH+1/40 / Cultivo D4 /
No 13	IH 1/640 / No / No
No 14	IH 1/1028 / Cultivo D2 / Elisa +
No 15	IH 1/2560 / Cultivo D2 / Elisa +
No 16	1/640 / Cultivo D2 / Elisa +/
No 17	1/1280 / No / Elisa +/
No 18	1/640/D2/Elisa+
No 19	1/1280 / D2 / Elisa +
No 20	1/640 / D4 / - /
No 21	1/40 / - / + /
No 22	1/10 / D2 / Elisa +
No 23	1/10 / No / Elisa +
No 24	Cultivo D1 -----
No 26	Cultivo D2 -----
No 29	Cultivo D2 IgM + -----
No 32	'----- IH: 1/10
No 33	'----- IgM+ -----
No 34	'----- IgM+ -----
No 35	Cultivo D4 ----- IH 1/40
No 36	Dengue D4 ----- IH 1/640
No 38	Dengue 2 IgM + -----
No 39	Dengue 2 IgM + IH 1/640
No 40	Dengue 2 IgM + IH 1/1280
No 41	'----- IgM+ -----
No 42	'----- IgM+ -----
No 43	-----
No 45	Dengue 2 IgM + -----
No 46	'----- IgM+ -----
	<b>Total 34 casos positivos por alguna técnica del total de 101 casos</b>

### Casos numerados Positivos

Cuadro No 1

### Casos Positivos para Dengue por cualquiera de las tres métodos diagnosticos

No. Caso	Elisa IGM	Inhibición Hemaglutinación	Cultivo Viral
2	-	-	Dengue 1
4	+	-	-
8	+	-	-
9	-	1/10	-
10	+	1/10	Dengue 2
11	-	-	Dengue 4
12	-	1/40	Dengue 4
13	-	1/640	-
14	+	1/1028	Dengue 2
15	+	1/2560	Dengue 2
16	+	1/640	Dengue 2
17	+	1/1280	-
18	+	1/640	Dengue 2
19	+	1/1280	Dengue 2
20	-	1/640	Dengue 4
21	-	1/40	-
22	+	1/10	Dengue 2
23	+	1/10	-
24	-	-	Dengue 1
26	-	-	Dengue 2
27	+	-	-
29	-	-	Dengue 2
32	-	1/10	-
33	+	-	-
34	+	-	-
35	-	1/40	Dengue 4
36	-	1/640	Dengue 4
38	+	-	Dengue 2
39	+	1/640	Dengue 2
40	+	1/1280	Dengue 2
41	+	-	-
42	+	-	-
43	-	-	Dengue 4
45	+	-	Dengue 2
46	+	-	-

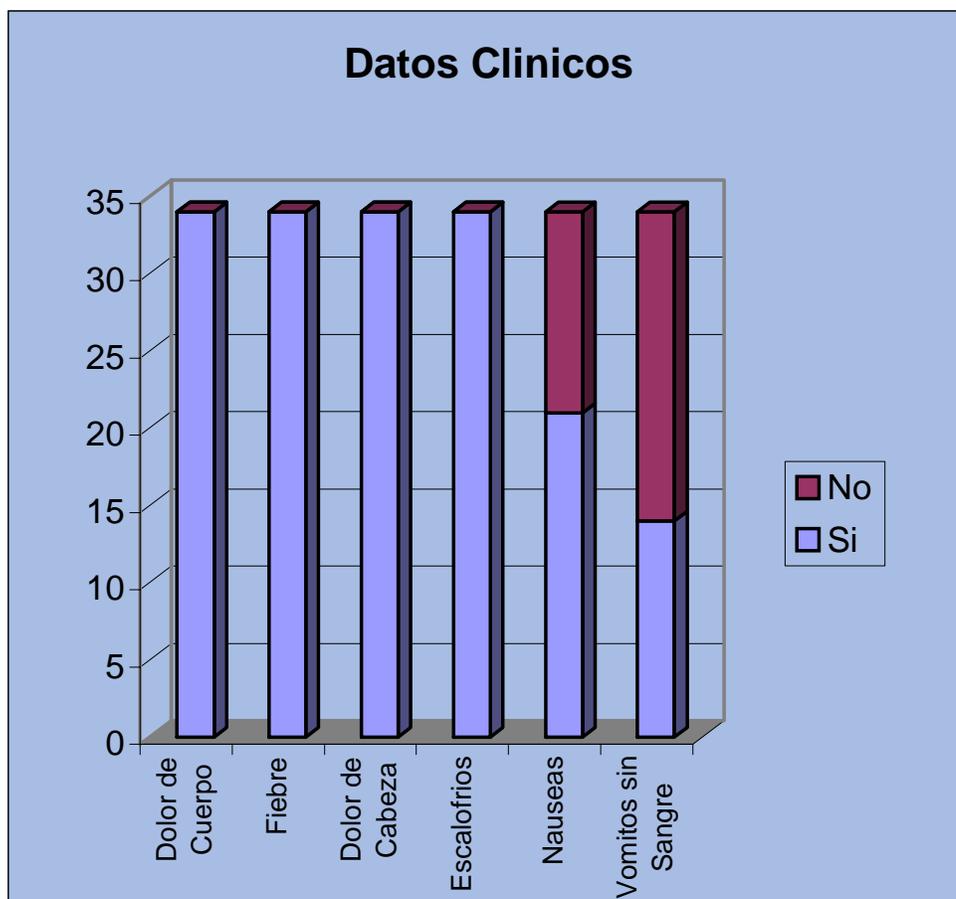
Cuadro No 3

Caracterización clínica, aislamiento viral y determinación de anticuerpos en pacientes con diagnóstico clínico de Dengue Clásico y/o Hemorrágico

## Datos Clínicos Importantes

	Si	No
Dolor de Cuerpo	35	0
Fiebre	35	0
Dolor de Cabeza	35	0
Escalofrios	35	0
Nauseas	21	14
Vomitos sin Sangre	14	21

Grafica No 3

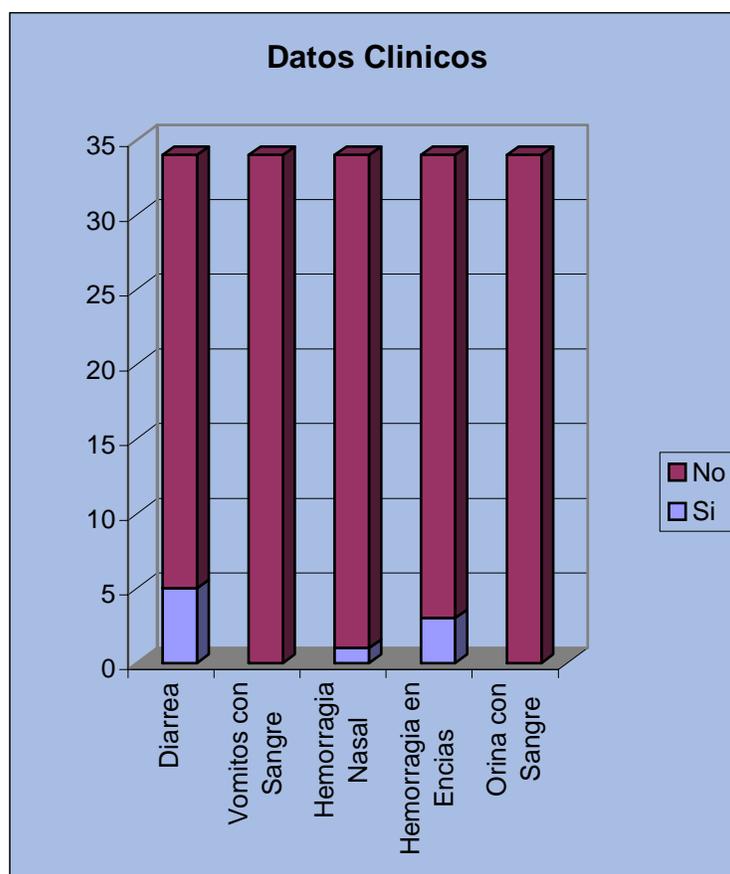


Cuadro No 4

## Datos Clínicos Importantes

Diarrea	5	30
Vomitos con Sangre	0	35
Hemorragia Nasal	1	34
Hemorragia en Encias	3	32
Orina con Sangre	0	35

Grafica No 4

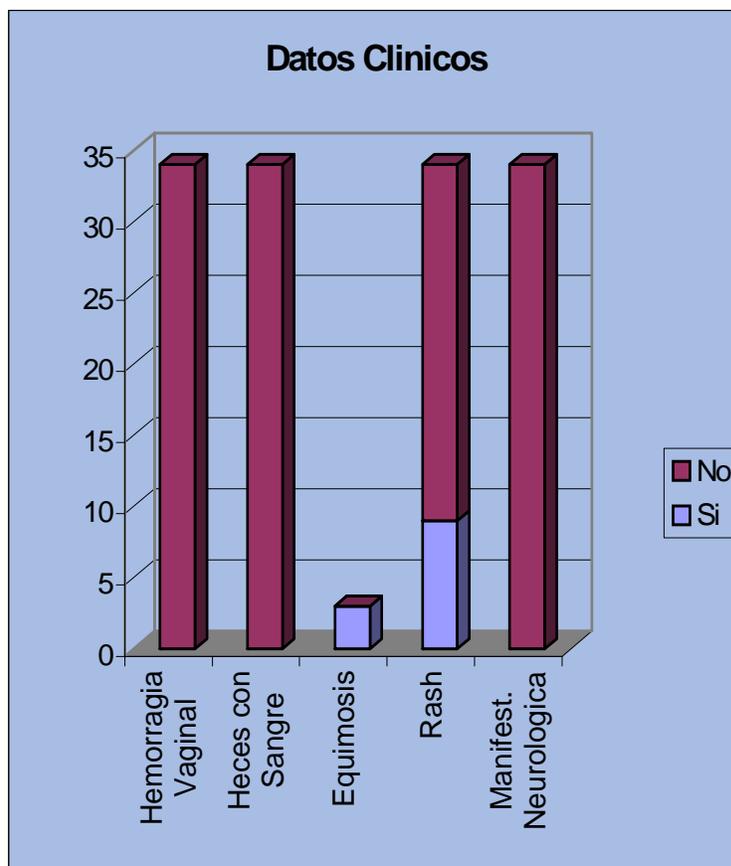


Cuadro No 5

## Datos Clínicos Importantes

Hemorragia Vaginal	0	35
Heces con Sangre	0	35
Equimosis	3	32
Rash	9	26
Manifest. Neurologica	0	35

Gráfica No 5

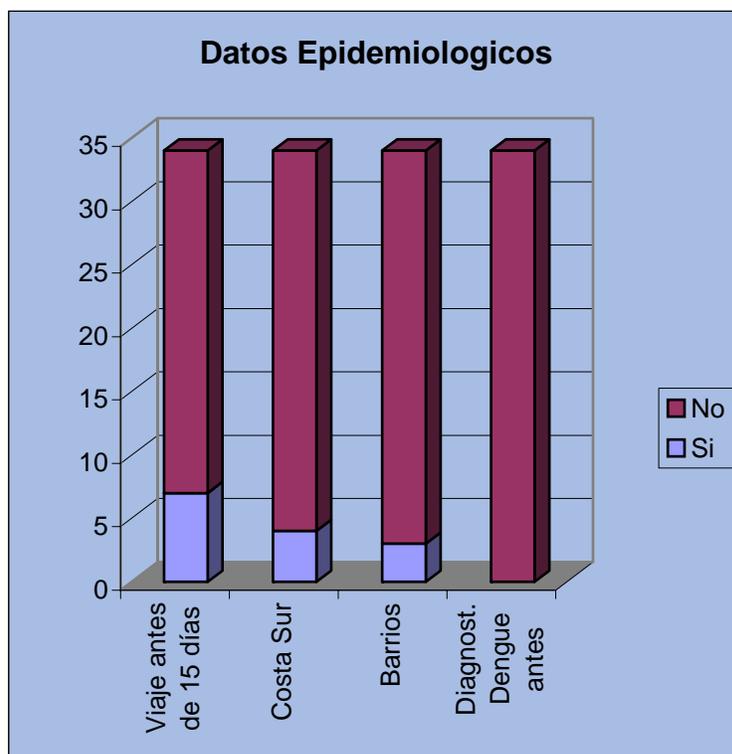


Cuadro No 8

## Datos Epidemiológicos

	Si	No
Viaje antes de 15 días	7	28
Costa Sur	4	31
Barrios	3	32
Diagnost. Dengue antes	0	35

Gráfica No 8

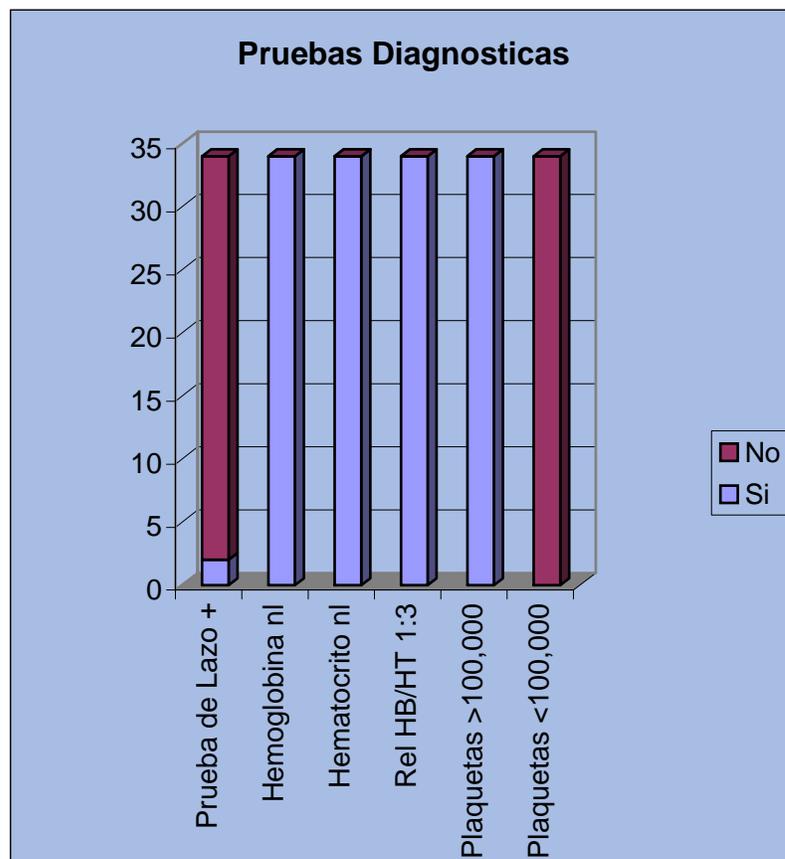


Cuadro No 6

## Pruebas Diagnosticas

	Si	No
Prueba de Lazo +	2	33
Hemoglobina nl	35	0
Hematocrito nl	35	0
Rel HB/HT 1:3	35	0
Plaquetas >100,000	35	0
Plaquetas <100,000	0	35

Gráfica No 6

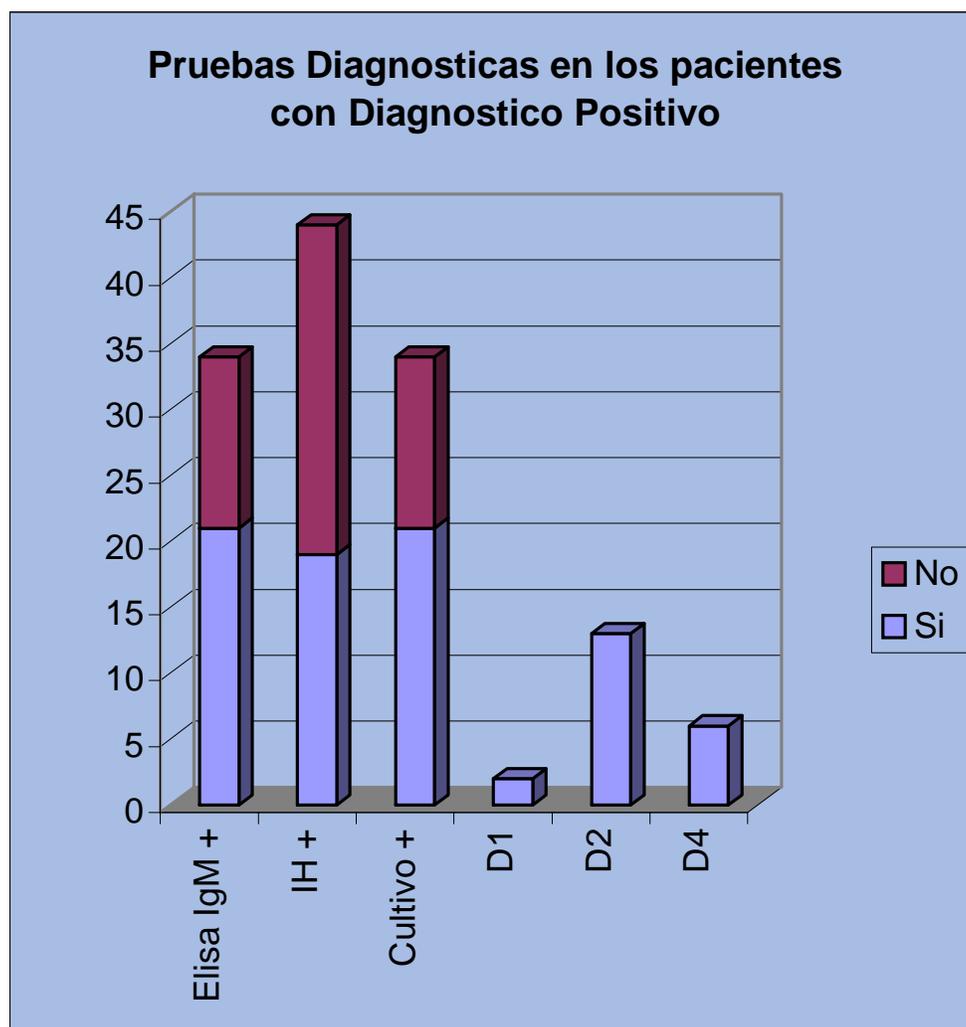


Cuadro No 7

## Pruebas Diagnosticas

	Si	No
Elisa IgM +	21	14
IH +	19	26
Cultivo +	21	14
Diag. Presunto Dengue	35	0
D1	2	
D2	13	
D4	6	

Gráfica No 7



## **CUADROS Y GRAFICAS**