

***INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL***

**“PEDRO KOURÍ”**

***Centro de Investigación, Diagnóstico y de Referencia***

***Departamento de Virología***

***Título: Proteína viral NS1 y anticuerpos IgA a virus dengue como nuevos marcadores para el algoritmo diagnóstico de la infección en Cuba.***

***Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias de la Salud***

***Didye Ruiz Amores***

***La Habana***

***2017***

***INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL***

***“PEDRO KOURÍ”***

***Centro de Investigación, Diagnóstico y de Referencia***

***Departamento de Virología***

***Título: Proteína viral NS1 y anticuerpos IgA a virus dengue como nuevos marcadores para el algoritmo diagnóstico de la infección en Cuba.***

***Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud***

***Autor: Lic. Didye Ruiz Amores, MSc***

***Tutores: Prof. Susana Vázquez Ramudo, DrCs***

***Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado, DrCs***

***La Habana***

***2017***

*A mi hermosa familia por todo el apoyo, la fuerza y el amor que siempre  
me han brindado para concretar todos mis sueños.*

*AGRADECIMIENTOS:*

*Tanto fueron los momentos vividos, tanto fue el profundo esfuerzo implementado, tanto fue el pensamiento concentrado en obtener el fin deseado, que, cuando el gran sueño es logrado, más que sentir el júbilo de la victoria adorada, de disfrutar en familia y amigos, de sentarnos a pensar cuanto cambiaría nuestra vida desde ese momento en adelante; debemos detener el tiempo por un momento y dar atrás al casete para reconocer y agradecer a aquellos que estuvieron presente contigo en todo momento, allí donde su mano fue extendida, allí donde con sus palabras "cuenta conmigo" te sentisteis que tenías alguien con la disposición sincera de ayudarte, aquel que con su sonrisa y amistad te pregunta a diario "como vas" "todo está bien".*

*Pues recordar no es solo volver a vivir, como dice la frase, es saber cuántos amigos tienes y cuantos has logrado en todo el recorrido de tu vida.*

*Quisiera agradecer en primera línea a los tutores de este trabajo, Dra. Susana y Dra. Lupe.*

*Susan como cariñosamente le digo, de mas esta decir que más que guía has sido como mi segunda madre, aunque por supuesto, ¡tremendo hijo adoptivo que adquiriste!, pero la realidad es que nada sustituye tu cariño, tus consejos, tu ejemplo, tu apoyo ante todo, así como la magnífica acogida de tu hermosa familia, la cual siempre ha hecho que me sienta como uno más de ustedes. No hay palabras para describir lo que realmente se siente dentro.....*

*Dr. Lupe, y le digo así porque creo que no aprendería a decirle simplemente Lupe, pues para mí, como creo le ocurre a muchos a mi alrededor, la ven como esa luz, ese ejemplo de excelencia a seguir, de investigadora, de guía nata para los jóvenes científicos, es inspiración pura, y aun llegando a su nivel tendría que decir: fue ella quien me inspiro a ser lo que soy. Gracias y mil gracias por ser parte de este trabajo.*

*A mis compañeros de laboratorio, esos que soportan mis locuras, pero que saben extender la mano y ayudarte en todo lo que puedas necesitar, que nos batimos en el día a día en el trabajo, pero que también encontramos los momentos para reír y disfrutar de nuestra compañía, caernos a cuentos y mentiras, donde un buen chiste puede alegrar el día, aun cuando podríamos levantarnos con dos pies izquierdos: mi hermana Naifi, la más joven de todas, Nilvia, los hijos adoptados Charly, Lianna y aquellos que la vida me arrebató, pero sé que van a crecer donde quiera que estén: Claudia, Patricia, Sheila y Ananda. También a Chiqui y Yami que siempre me dieron fuerzas para seguir adelante con todo este proyecto.*

*A todo el equipo de Arbovirus, encabezado por Mayling y Ariel*

*A mis compañeros de año, de los que ya casi no queda ninguno: Alienys, de cariño "el body", Yuliet, de cariño la pequeña, ya bien crecida y todos aquellos que gratificadamente nos seguimos comunicando por el Facebook,*

*A todos los compañeros del Dpto. de Virología que siempre han estado al tanto de mi progreso y desarrollo.*

*A todos los miembros del presente tribunal y el de predefensa que han hecho que me gradúe con todos los méritos necesarios.*

*Y por último:*

*A mi gran familia, a la cual redacté con mucho orgullo la dedicatoria de este trabajo, pues siempre han estado ahí, firmes, atentos, con el amor a flor de piel y el corazón entregado. De los que puedo estar feliz de decirle a Dios: gracias, y muchas gracias por darme esta familia, por ser parte de ella, por haber aprendido tanto de ella y aún sigo aprendiendo, porque me he dado cuenta que podemos ser todo lo que queramos, podemos*

*lograr mucho en esta vida, podemos conquistar el mundo y rendirlo a nuestros pies, pero si en esas victorias, a tu lado no llega estar el núcleo, el centro de poder, la energía y el amor que no es más que la familia, solo llegas a ser como una estrella fugaz, pasas, te pierdes en el horizonte y después nadie más te llega a recordar.*

*Gracias a todos, muchas gracias.*

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
<b>ABS</b>	Albúmina Bovina Sérica
<b>AcM</b>	Anticuerpo Monoclonal
<b>AcP</b>	Anticuerpo Policlonal
<b>ADA</b>	Amplificación Dependiente de anticuerpos
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>AP61</b>	Células de mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BHK21</b>	Células de riñón de Hámster
<b>C</b>	Proteína del Core
<b>C636</b>	Células de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
<b>CCDA</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CO</b>	Valor de corte
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CPHEM</b>	Centro Provincial de Higiene e Epidemiología y Microbiología
<b>Den</b>	Dengue
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E</b>	Proteína de envoltura
<b>ECP</b>	Efecto citopático
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático sobre fase sólida, del inglés: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FA</b>	Fiebre amarilla
<b>Fc</b>	Receptor celular
<b>FD</b>	Fiebre del Dengue
<b>FHD</b>	Fiebre Hemorrágica del Dengue
<b>GPI</b>	Glycosyl-phosphatidylinositol
<b>H2O2</b>	Peróxido
<b>H2SO4</b>	Ácido sulfúrico
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IPK</b>	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
<b>IH</b>	Inhibición de la Hemaglutinación
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>LLCMK2</b>	Células de riñón de mono Verde Africano

<b>LNR</b>	Laboratorio Nacional de Referencia
<b>L T</b>	Linfocitos T
<b>L B</b>	Linfocitos B
<b>M</b>	Proteína de Membrana
<b>MAC-ELISA</b>	ELISA de Captura de anticuerpos IgM, del inglés: <i>IgM antibody capture ELISA</i>
<b>MEI</b>	Método de ELISA de Inhibición
<b>MINSAP</b>	Ministerio de Salud Pública
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>M</b>	Macrófago
<b>NIAID</b>	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas
<b>NK</b>	Células asesinas
<b>NS</b>	Proteína no estructural
<b>NTR</b>	Región no traducida de genoma del dengue
<b>OPD</b>	O-fenilendiamina
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAF</b>	Factor activador de plaquetas
<b>PBS</b>	Solución tampón fosfato-salina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<b>PCR-TR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PNRP</b>	Prueba de Neutralización por reducción de placas
<b>prM</b>	Precursor de la proteína M
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>S</b>	Coefficiente de sedimentación
<b>SCD</b>	Síndrome de choque por dengue
<b>SHN</b>	Suero Humano Normal
<b>STF</b>	Suero de ternera fetal
<b>SUMA</b>	Sistema Ultra Micro Analítico
<b>T-20</b>	Tween 20
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TPG</b>	Título promedio geométrico
<b>UH</b>	Unidades hemaglutinantes
<b>VERO</b>	Células de riñón de mono
<b>VSR</b>	Virus Sincitial Respiratorio

## SÍNTESIS

En el presente trabajo se evaluó la proteína viral NS1 y los anticuerpos IgA como marcadores de infección temprana a virus dengue y su posible inclusión en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad en el país. La proteína NS1 fue evaluada mediante los sistemas comerciales Platelia Dengue NS1 Antigen y SD Dengue Duo, mientras que para la IgA se utilizó el ELISA de doble anticuerpo modificado y el sistema comercial MP Diagnostics ASSURE Dengue IgA rapid test. Los ensayos PCR-TR, MAC-ELISA y MEI fueron empleados como referencia en la selección de las muestras y la confirmación de los casos. La proteína NS1 demostró ser un buen marcador de infección temprana, con los mayores porcentajes de positividad en los primeros cuatro días de infección. Se propone un 5to día de colecta con posibilidades diagnósticas. La presencia de IgG antidengue en suero influyó en la detección de NS1 para casos secundarios. Los anticuerpos IgA definen una aparición temprana pero sólo en casos secundarios y con porcentajes de positividad muy bajos. Se propuso incorporar la NS1 a la nueva propuesta de algoritmo diagnóstico para dengue pero no la IgA. Este nuevo algoritmo permitirá un diagnóstico temprano y rápido, contribuyendo al manejo del paciente y control de la transmisión de dengue en el país.

**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN .....	2
HIPÓTESIS: .....	5
OBJETIVOS: .....	5
NOVEDAD CIENTÍFICA. ....	7
VALOR TEÓRICO-PRÁCTICO. ....	7
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
I.1- Historia del dengue. ....	9
I.2-Clasificación, Estructura y composición del virus dengue. ....	10
I.3-Características de las proteínas virales. ....	12
I.3.1-Proteínas estructurales: .....	12
I.3.2-Proteínas no estructurales: .....	13
I.4-Replicación viral.....	15
I.5-Propiedades físico-químicas del virus dengue. ....	16
I.6-Propiedades antigénicas.....	16
I.7-Situación Epidemiológica del Dengue. ....	17
I.7.1. Situación Epidemiológica Mundial: .....	17
I.7.2. Situación Epidemiológica en Cuba: .....	17
I.8- Manifestaciones Clínicas.....	18
I.9-Patogenia. ....	21
I.10- Respuesta Inmunitaria. ....	23
I.10.1-Inmunidad innata y adaptativa: .....	23

I.10.2-Respuesta humoral de anticuerpos:.....	24
I.11- Diagnóstico de Laboratorio. ....	26
I.11.1-Diagnóstico Viroológico:.....	26
I.11.2-Diagnóstico Molecular:.....	27
I.11.3-Detección del antígeno: .....	27
I.11.4-Diagnóstico Serológico:.....	28
I.11.5. Algoritmo diagnóstico actual para la infección por virus dengue en Cuba: .....	30
I.12- Utilidad de los métodos diagnósticos para la investigación. ....	33
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
II.1 Diseño general de la investigación: .....	37
II.2. Universo de estudio para la evaluación de la proteína viral NS1. ....	38
II.3. Método ELISA de doble anticuerpo para la detección de la proteína NS1 del virus dengue en suero: Sistema Comercial Platelia Dengue NS1 Antigen (Platelia NS1) .....	39
II.4. Prueba rápida para la detección de la proteína NS1 en suero: Sistema Comercial SD Dengue Duo (SD Duo). ....	41
II.5. Análisis estadístico para la evaluación de la proteína viral NS1. ....	42
II.6. Universo de estudio para la evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue. ....	42
II.7. Método de ELISA de doble anticuerpo modificado para la detección de IgA específica a virus dengue (ELISA-IgA). ....	44
II.8. Sistema comercial MP Diagnostics ASSURE Dengue IgA rapid test para la detección de anticuerpos IgA específicos a virus dengue (MPD-IgA). ....	45
II.9. Análisis estadístico para la evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue. ....	47

II.10. Aspectos éticos. ....	47
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>48</b>
III.1. Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Platelia NS1 en la detección de la proteína viral NS1 frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK.....	48
III.2. Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial SD Duo en la detección de la proteína viral NS1 frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK .....	51
III.3. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial Platelia NS1...	55
III.4 Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación a la sensibilidad al serotipo viral infectante y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial Platelia NS1.....	58
III.5. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial SD Duo .....	60
III.6. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación a la sensibilidad al serotipo viral infectante y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial SD Duo.....	63
III.7. Evaluación de los indicadores de desempeño del sistema no comercial ELISA-IgA para la detección de los anticuerpos IgA a virus dengue frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK. ....	64
III.8. Evaluación de los indicadores de desempeño del sistema comercial MPD-IgA para la detección de los anticuerpos IgA a virus dengue frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK .....	66

III.9. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue como marcadores diagnósticos en la fase febril temprana de la enfermedad en relación al momento de colecta de la muestra y al tipo de infección mediante el sistema ELISA-IgA .	68
III.10. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue en relación a la reactividad cruzada a los diferentes serotipos y al tipo de infección en muestras colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas mediante el sistema ELISA-IgA.	73
III.11. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección en muestras colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas mediante el sistema comercial MPD-IgA.	75
III.12. Propuesta de algoritmo diagnóstico en función de los resultados obtenidos de la evaluación de la proteína viral NS1 y de los anticuerpos IgA como marcadores de la infección temprana a virus dengue. Discusión General.	79
CONCLUSIONES.	84
RECOMENDACIONES.	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	88
ANEXOS	108

# *INTRODUCCIÓN*

## INTRODUCCIÓN

De las enfermedades emergentes transmitidas por la picada del mosquito (género *Aedes*, sp: *aegyptis* y *albopictus*), el Dengue se ha convertido en la más importante en términos de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Es un problema de Salud Pública con una incidencia global creciente y se distribuye geográficamente en regiones tropicales y subtropicales, mostrando una elevada diseminación de los cuatro serotipos virales (Den1-4). Se estima que más de 2.5 mil millones de personas están en riesgo o viven en países endémicos y aproximadamente 50 millones son infectados anualmente, de ellos entre 250 000 y 500 000 desarrollan el cuadro severo de la enfermedad, causando cerca de 25 000 defunciones (1, 2).

En Cuba se introduce el serotipo 1 (Den-1) del virus dengue en 1977 resultando en más de 500 000 casos. Cuatro años después (1981) se produce la introducción del serotipo 2 (Den-2), epidemia que se reconoce como la primera de dengue hemorrágico en el país y para la región de las Américas. En ella se reportaron más de 400 000 casos, con 10312 casos graves y 158 casos fatales de ellos 101 niños (3, 4). Después de 16 años de ausencia (1997), el Den-2 reemerge en el país, localizado en la provincia de Santiago de Cuba y caracterizando la epidemia de tipo hemorrágica, con índices mayores de infestación del vector y de severidad de la enfermedad con respecto a la epidemia del 1981 (5). Esta epidemia resultó en aproximadamente 5000 casos, de ellos 205 severos y 12 defunciones. Fue controlada rápidamente por las autoridades sanitarias. Un brote limitado con una duración de tres meses en el año 2000 mostró la introducción del serotipo 4 (Den-4), localizado en La Habana con 138 casos confirmados (6). Luego, en el 2001-02 ocurre otra gran epidemia con la introducción del serotipo 3 (Den-3), igualmente afectando la capital del país, donde se confirman serológicamente 12889 casos, incluyendo 78 graves y 3 fatales, todos adultos.(6, 7). Posterior a este periodo, la situación epidemiológica del país cambia, acercándose a lo que pudiera ser una posible endemia. Las grandes epidemias presentadas (2006 y 2014) no fueron bien documentadas (8) y la circulación de un solo serotipo viral desaparece, observándose dos o más circulando al mismo tiempo. De igual manera, los brotes que aparecieron entre estas dos grandes epidemias se caracterizaron por la circulación de al menos dos serotipos virales. Sumado a esto, otras arbovirosis son detectadas en el país con casos importados de Chikungunya en el 2015 y transmisión de virus Zika a partir del 2016.

Los objetivos de la vigilancia de laboratorio para la enfermedad del dengue son: la detección y confirmación temprana de la transmisión, el seguimiento y caracterización de las epidemias, y la certificación del cese de la transmisión, unido todo a su utilidad para guiar la implementación de medidas para el manejo clínico del paciente y el control del vector en la comunidad (9).

Las guías de la Organización Mundial de la Salud (2009) reconocen tres ensayos como los de referencia para la confirmación de la infección por virus dengue: aislamiento e identificación viral (A. Viral), detección genómica mediante la reacción reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR del inglés: reverse transcription-polymerase chain reaction) y el PCR en tiempo real (PCR-TR), y los métodos serológicos para la detección de anticuerpos IgM e IgG (10). Los métodos virológicos (A. Viral/RT-PCR/PCR-TR) permiten confirmar el agente etiológico de la infección, mientras que los métodos serológicos (IgM/IgG) son métodos indirectos, que brindan un diagnóstico presuntivo, no obstante son ampliamente utilizados por muchos laboratorios, principalmente aquellos que no presentan las condiciones necesarias para la aplicación de los métodos virológicos (11).

Todos estos métodos presentan limitaciones en sus actuales aplicaciones como parte de las estrategias diagnósticas aplicadas en la región. El A. Viral es un método complejo, costoso y los resultados son obtenidos regularmente de 6 a 10 días, en aquellos laboratorios con una infraestructura apropiada para el servicio de cultivos celulares o colonias de mosquitos. Con la RT-PCR se pueden lograr resultados en 24 horas pero son ensayos también costosos que requieren de laboratorios con equipos especializados, además de que la muestra debe colectarse en los primeros días de la fiebre. Por su parte, los sistemas inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA del inglés: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) y los inmunocromatográficos de tiras rápidas para la detección de anticuerpos IgM/IgG pueden dar resultados en pocas horas e incluso minutos, pero la detección de anticuerpos IgM en pacientes infectados con dengue solo es posible a partir del 6to día del comienzo de los síntomas y la confirmación por anticuerpos IgG requiere de sueros pareados. Estos métodos no pueden ser utilizados para un diagnóstico temprano (12, 13). Otra de sus desventajas es que estos anticuerpos muestran reactividad cruzada a otros flavivirus, lo cual puede interferir en la identificación ante una posible circulación (13).

La estrategia cubana de vigilancia de laboratorio trabaja acorde a los periodos de no transmisión y transmisión. Durante el periodo de no transmisión el algoritmo se sostiene sobre la base de los métodos serológicos, métodos que representan un diagnóstico tardío pero que permiten la confirmación de los casos. Tres son los métodos utilizados: Sistema Ultra Micro Elisa Dengue IgM Plus (SUMA-IgM) (11, 14), Sistema ELISA de Captura de IgM (MAC-ELISA) (15) y el Método de ELISA de Inhibición (MEI) (16) para detección de anticuerpos IgG a dengue. El SUMA-IgM es desarrollado por el Centro de Inmunoensayo (CIE, Cuba) y distribuido en los Centros de Provinciales y Municipales de Higiene e Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país. El MAC-ELISA y el MEI son sistemas centralizados en el Laboratorio Nacional de Referencia para el dengue en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNR-IPK). Estos métodos trabajan con muestras colectadas posteriores al 5to día del inicio de los síntomas. Por otra parte, cuando se establece el periodo de transmisión en el país, se mantiene el diagnóstico serológico activo, y se comienza a realizar el diagnóstico molecular mediante la PCR-TR y el A. Viral, con el objetivo fundamental de identificar el agente viral causante del brote o epidemia, trabajando con muestras colectadas en la fase febril temprana de la enfermedad.

Mejoras sobre este algoritmo diagnóstico pueden ser implementadas mediante la introducción de metodologías rápidas, menos complejas y menos costosas, así como la incorporación de nuevos marcadores diagnósticos que permitan la confirmación de la infección por el virus dengue en la etapa temprana de la enfermedad.

En los últimos años se le ha dado especial atención a la búsqueda de nuevos marcadores que permitan acelerar el diagnóstico de dengue. En este sentido se vislumbra como una alternativa el empleo de la detección de la proteína viral NS1, una glicoproteína altamente conservada y antigénica. Es secretada al medio extracelular durante el proceso de multiplicación viral, lo cual facilita su detección en muestras de suero o plasma colectadas en la etapa virémica (17, 18), tanto en pacientes con infección primaria así como con infección secundaria (19).

También los anticuerpos IgA anti-dengue son señalados por algunos autores como otra alternativa, valorando su utilización como marcador diagnóstico mediante su detección en la

fase febril temprana de la enfermedad (20), utilidad para definir una infección reciente dada su corta duración en sangre (21, 22) y posible definición de una infección secundaria (15, 23).

Teniendo en cuenta los criterios antes expuestos la presente investigación trabajará sobre la base de cuatro ensayos para el estudio de los nuevos marcadores para el algoritmo diagnóstico de dengue en Cuba. Los estuches comerciales Platelia Dengue NS1 Antigen (Platelia NS1) y SD Dengue Duo (SD Duo) serán utilizados para el estudio de la proteína viral NS1 y el ELISA de doble anticuerpo modificado (ELISA-IgA) desarrollado en el IPK, junto con el estuche comercial MP Diagnostics ASSURE Dengue IgA rapid test (MPD-IgA) para el estudio de los anticuerpos IgA a virus dengue (24-26). La evaluación de estos sistemas en muestras colectadas de una población cubana permitirá valorar la posible utilidad de estos marcadores en el actual algoritmo diagnóstico, tanto en la confirmación temprana de la infección, importante para el manejo del paciente, como la toma de acciones sobre el control del vector en las áreas en transmisión.

## **HIPÓTESIS:**

La incorporación de los sistemas comerciales y no comerciales para la detección de la proteína viral NS1 y los anticuerpos IgA a virus dengue, al algoritmo diagnóstico actual de la enfermedad en Cuba, permitirán una confirmación temprana de la infección, así como la definición de los casos con infección secundaria.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General:**

Proponer un algoritmo diagnóstico con la incorporación de los sistemas comerciales y no comerciales para la detección de la proteína viral NS1 y los anticuerpos IgA a virus dengue en la fase febril temprana de la enfermedad.

**Objetivos Específicos:**

- ❖ Evaluar los indicadores de desempeño en los sistemas comerciales Platelia NS1 y SD Duo para la detección de la proteína viral NS1 frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK.
- ❖ Evaluar la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación al momento de colecta de la muestra, tipo de infección y sensibilidad al serotipo viral infectante mediante los sistemas Platelia NS1 y SD Duo.
- ❖ Evaluar los indicadores de desempeño del sistema no comercial ELISA-IgA y comercial MPD-IgA para la detección de los anticuerpos IgA a virus dengue frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK.
- ❖ Evaluar los anticuerpos IgA a virus dengue como marcadores diagnósticos en la fase febril temprana de la enfermedad en relación al momento de colecta de la muestra, tipo de infección y reactividad cruzada a los serotipos virales mediante los sistemas ELISA-IgA y MPD-IgA.

### **NOVEDAD CIENTÍFICA.**

La presente investigación permitió profundizar en el conocimiento de la proteína viral NS1 y los anticuerpos IgA como marcadores de la infección temprana por virus dengue, en muestras colectadas en una población cubana en relación al momento de la toma de la muestra, tipo de infección y respuesta frente al serotipo viral infectante dada las condiciones epidemiológicas de nuestro país con relación al dengue. También mediante la evaluación de los sistemas inmunoenzimáticos comerciales y no comerciales disponibles en el estudio fueron valoradas sus utilidades así como su inclusión en el actual algoritmo diagnóstico del dengue en el país.

### **VALOR TEÓRICO-PRÁCTICO.**

Los resultados obtenidos del presente estudio permitieron definir a la proteína NS1 como un marcador útil para ser incorporado en un nuevo algoritmo diagnóstico, lo cual contribuirá a una respuesta más rápida de los resultados, un mejor seguimiento de los brotes como parte de la vigilancia epidemiológica y de laboratorio, mayor eficiencia en la intervención sobre los pacientes hospitalizados y el control del vector transmisor de la enfermedad en las áreas afectadas

*CAPÍTULO I:*  
*REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### I.1- Historia del dengue.

El origen de los virus del complejo dengue ha estado sujeto a mucha discusión. De acuerdo a los datos disponibles es imposible concluir si su verdadero origen proviene del continente africano o del continente asiático. Algunos autores han propuesto a África, basado en la circulación de varios flavivirus y el origen africano de su principal vector el *Aedes aegypti*. Los argumentos para apoyar el origen africano del virus dengue están en paralelo con la aparición del virus de fiebre amarilla (VFA), el cual comparte el mismo vector transmisor y fue introducido en las Américas durante la trata de esclavos hace 300-400 años, donde estableció ciclos selváticos que persisten hasta hoy (27).

Ha sido propuesta la hipótesis de que estos virus pueden tener su origen en un ciclo selvático que involucró monos inferiores y mosquitos (*canopy-dwelling*). Sin tener en cuenta el origen geográfico, los virus del complejo dengue evolucionaron como virus de mosquito antes de adaptarse a los monos inferiores y a los humanos. Biológicamente estos virus son altamente adaptados a sus mosquitos hospederos, mantenidos en la transmisión vertical en especies de mosquito responsables de los ciclos selváticos con amplificación periódica en los monos inferiores, estos ciclos se han documentados en el sudeste de Asia para los cuatro serotipos y en África para el serotipo Den-2 (28).

El primer registro potencial de un caso de dengue viene de una enciclopedia médica china de la Dinastía Jin de 265 a 420. Esa referencia asocia “agua venenosa” con el vuelo de insectos. El primer reporte de un caso definitivo data de 1789 y es atribuido a Benjamin Rush, quien acuña el término "fiebre rompehuesos" por los síntomas de mialgias y artralgias (29). La etiología viral y su transmisión por mosquitos fue descifrada solo en el siglo XX y los movimientos poblacionales durante la segunda guerra mundial expandieron la enfermedad globalmente a nivel de pandemia. Graham en 1902 demostró la capacidad de los mosquitos para transmitir dengue (28, 30).

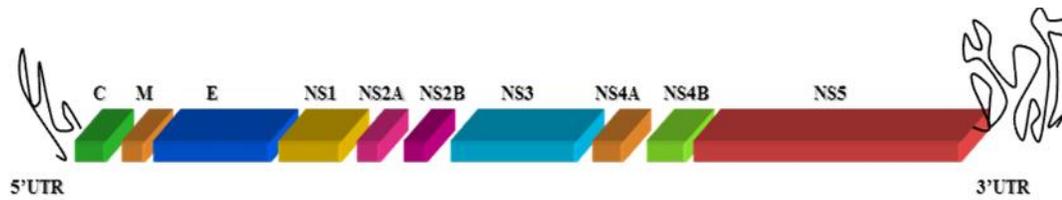
La enfermedad ha tenido gran variedad de nombres tanto como regiones o países que ha afectado. De esta forma se ha denominado, entre otras, “La piadosa” y “Fiebre Quebranta Huesos” en España (1784-86), “Ephemeral fever” en Calcuta India (1824), “Dandy Fever”, en Santo Tomás, Islas Vírgenes (1827), “Fiebre Polka” en Brasil (1845-49), “Three-day or Seven-day Fever” en la India (1909) y “Ban-Sha” en Taiwán. A partir de la década de 1960-70 se denominó Fiebre del Dengue (FD) a la forma clásica y Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD) a la forma severa de la enfermedad (31).

El virus dengue se aisló por primera vez en Hawai en 1944, se denominó Den 1 y en el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó Den 2 (32). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con sintomatología compatible con dengue hemorrágico (33)

## **I.2-Clasificación, Estructura y composición del virus dengue.**

El virus dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Existen cuatro serotipos del virus, para los que se ha descrito una homología de secuencia de un 70% aproximadamente (34). Esta homología es mayor para Den-1, Den-3 y Den-4, no así para Den-2, el que parece diferir en su origen evolutivo (35, 36).

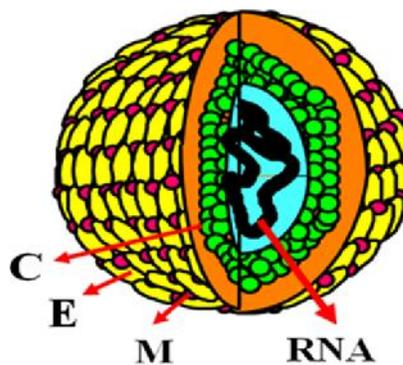
El genoma del virus dengue, al igual que todos los flavivirus, tiene por característica la presencia de una caperuza (cap) en su extremo 5' y la carencia de una cola poliadenilada en su extremo 3' (37). Presenta además un marco de lectura abierto (ORF: del inglés Open Reading Frame) que varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del virus, incluso entre un mismo serotipo. El genoma está compuesto por los genes que codifican para tres proteínas estructurales: de Cápsida (C, 100 aa), de Membrana (M, 75 aa), y de Envoltura (E, 595 aa) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (38, 39). El orden de las proteínas en la región codificable es 5 -C-prM (M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3 (40) (figura I.1).



Fuente: Eva Harris, Curso Dengue (IPK) 2005.

**Figura I. 1. Representación esquemática del orden en que se organizan los genes que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales en el genoma del virus.**

El virión maduro sedimenta entre 170 y 210 S, tiene una densidad de 1,19 a 1,23 g/mL y está compuesto por 6% de ARN, 66% de proteínas, 9% de carbohidratos y 17% de lípidos (41). Presenta un diámetro de 50 nm, un ARN de simple cadena de polaridad positiva que se encuentra recubierto por la proteína C y las proteínas E y M, las cuales se encuentran asociadas formando la bicapa lipídica que da lugar a las proyecciones que salen de la superficie de los viriones (figura I.2.1).



Fuente: Curso dengue (IPK) 2013

**Figura I. 2. Representación esquemática de la estructura del virus dengue (C: cápsida, E: envoltura, M: membrana y RNA: genoma viral).**

### **I.3-Características de las proteínas virales.**

La traducción del genoma durante su ciclo replicativo forma una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos que tras un procesamiento proteolítico tanto por proteasas celulares como por proteasas virales específicas, da lugar a las tres proteínas estructurales y a las siete no estructurales (42).

#### **I.3.1-Proteínas estructurales:**

**La proteína de cápsida (C)** es el primer polipéptido viral sintetizado. Es altamente básico, lo que se cree que influye en su interacción con el ARN (43).

**El precursor glicosilado (prM)** da lugar a la proteína de membrana M durante la etapa de maduración viral. Este evento parece ser crucial y terminal para la morfogénesis del virión. El segmento pr del amino terminal es secretado al medio extracelular. El corte proteolítico ocurre un poco antes o coincidiendo con la liberación del virión, pues prM y M se encuentran en viriones intracelulares y extracelulares, respectivamente. El segmento de pr del amino terminal es predominantemente hidrofílico y contiene de uno a tres sitios de glicosilación y seis residuos de cisteína conservados, que participan en los puentes disulfuro intramoleculares (43).

**La proteína de membrana (M)** localizada en la porción carbono terminal de la prMse presenta en los viriones maduros y contiene un ectodominio acortado, seguido por dos dominios potenciales extendidos sobre la membrana. Los anticuerpos contra prM pueden mediar la inmunidad protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contiene proteínas prM no procesadas (44).

**La glicoproteína de envoltura (E)** constituye la proteína más grande del virión y es el componente principal de las proyecciones de la superficie del mismo. Según el modelo estructural propuesto para esta proteína, tiene tres dominios antigénicos no superpuestos, designados como A, B y C, los cuales están compuestos por al menos 16 epítopes. Los dominios funcionales están relacionados con la neutralización de los viriones, la

hemaglutinación de los eritrocitos de ganso, la fusión intraendosomal a pH ácido y la unión a los receptores celulares específicos situados en la superficie celular. Otro modelo antigénico de la proteína E lo constituyen tres dominios reconocidos en la cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína E, distinguidos como dominios I, II y III, en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria (43, 45).

Como característica inusual de la proteína E, se plantea que su actividad de fusión a la membrana está regulada por la interacción con la proteína prM y se cree que su asociación con prM estabiliza ciertos epítopes sensibles, por tanto, previenen los cambios conformacionales que normalmente ocurren a pH ácido y mediante los cuales se produce la actividad fusogénica de la proteína E (43, 45).

### **I.3.2-Proteínas no estructurales:**

**La proteína NS1** es la primera proteína no-estructural que aparece en la conformación del genoma del virus dengue, después de la proteína E y precediendo a NS2a. Es una glicoproteína de aproximadamente 46 kDa, con dos asparaginas glicosiladas y 12 cisteínas que forman 6 puentes disulfuro. Experimentos realizados en ratones infectados con virus dengue han demostrado que la deglicosilación de la proteína NS1 disminuye la neurovirulencia del virus dengue, lo que atribuye gran importancia a los dos potentes sitios glicosilados de la proteína en el ensamblaje, maduración y transporte de los viriones maduros (46). La NS1 es esencial para la viabilidad del virus pero no ha sido establecida su actividad biológica. Experimentos “in vitro” en células de mamíferos infectados con virus dengue han demostrado que durante la traducción del genoma la proteína NS1 se desplaza en el lumen de Retículo Endoplasmático (RE) donde dimeriza y permanece asociada a la membrana de este organelo, aunque no contiene una región hidrofóbica que atraviese a la misma (47). De igual modo puede ser exportada por el camino excretor de Golgi y aparecer en la membrana citoplasmática exterior de las células infectadas, anclada a la misma por un grupo fosfatidilinositol glicosilado (GPI) (48) o liberada como un hexámero soluble (49).

Estudios “in vivo” demuestran la presencia de la proteína NS1 en sueros obtenidos en la fase aguda en pacientes infectados con virus dengue (17, 50). Las concentraciones de la NS1 en

suero varia en dependencia del serotipo viral, del momento de la infección y del hospedero, siendo más altas en individuos que sufren FHD cuando se compara con pacientes que sufren FD (51). Ac contra NS1 desarrollados durante la infección pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad debido a la reactividad cruzada con los Ag en la superficie de las células endoteliales o con las plaquetas, induciendo su activación o causando su muerte por apoptosis o lisis mediada por complemento (52-55).

**La proteína NS2** está constituida por dos proteínas, la NS2a y la NS2b. La primera se ha identificado como una proteína hidrofóbica de 20 kDa..Se localiza en los supuestos sitios de replicación del ARN, donde participa en el reclutamiento de los tripletes de ARN necesarios para la replicasa que se encuentra unida a la membrana (56). Presenta varios dominios de transmembrana que se requieren para el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1 (57).

La proteína NS2b se requiere para el funcionamiento como cofactor en el complejo NS2b-NS3 con actividad proteasa a partir de una región en su dominio de 40 aminoácidos (58). Este complejo es responsable, junto con la peptidasa señal del hospedero, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales y de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C (59, 60).

**La proteína NS3** se sugiere sea una proteasa viral activa en el procesamiento postraduccional de la poliproteína, o un componente de la polimerasa viral de ARN o una proteína con ambas actividades enzimáticas (61). Esta proteasa específica de serina, procesa el precursor de poliproteína en proteínas maduras junto con la peptidasa señal del hospedero, y requiere de la proteína NS2b como cofactor. Recientemente se ha descrito su estructura cristalina, lo que combinado con los sustratos peptídicos de su sitio activo, ha sugerido qué residuos están involucrados en el reconocimiento del sustrato, así como la base estructural para explicar los efectos de mutaciones sobre la actividad enzimática. Esto es útil para el desarrollo de inhibidores específicos como terapéutica contra el dengue y otras proteasas de los flavivirus (61).

**La proteína NS4** se deriva de dos proteínas: NS4a y NS4b. Se piensa que estas unidades sean cofactores del complejo enzimático de replicación del ARN (44).

**La proteína NS5** es la polimerasa viral de ARN dependiente de ARN, esencial para la replicación viral(44).

#### **I.4-Replicación viral.**

Se sugiere que los flavivirus interactúan con las células a través de dos mecanismos: interacción del virus con el receptor celular, es decir, endocitosis mediada por el receptor (62) y unión del virus a la célula por formación de inmunocomplejos (63), donde el virión forma complejos con las inmunoglobulinas de tipo IgG, las cuales se unen a las células susceptibles por sus receptores Fc.

Independientemente del tipo de interacción virus-célula, ocurre la internalización de este, formándose el endosoma, compartimiento donde ocurre la fusión de la envoltura del virus con las membranas de la célula, lo cual parece ser dependiente del pH. Las condiciones acídicas activan la fusión de la proteína E tras sufrir determinados cambios conformacionales, lo cual permite la penetración de la nucleocápsida al citoplasma. El tratamiento de las células infectadas con bases débiles inhibe la replicación de los flavivirus en ciertas células y causa la acumulación de viriones en el endosoma (64, 65).

El virus dengue inicia el proceso de replicación mediante la síntesis de la hebra negativa complementaria, la que utiliza como molde para la producción de nuevas moléculas de ARN positivo. Estas últimas hebras actúan como un ARN mensajero para la traducción de la poliproteína, como un molde para la síntesis de la hebra negativa o simplemente para ser encapsidada dentro del virión (37, 66). Las proteínas NS3 y NS5 participan en la replicación viral, principalmente en la síntesis de la hebra negativa complementaria y en el paso de formas replicativas (FR) a intermediarios replicativos (IR) (67-69).

El ensamblaje de la nucleocápsida a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente. Las partículas virales son llevadas en vesículas de

transporte que salen de la membrana del RE y por un mecanismo específico, son transportadas al pre-Golgi, pasando posteriormente al aparato de Golgi (41). La escisión de las proteínas prM, M, E y NS1 tiene lugar en las vesículas ácidas del post-Golgi. La escisión de la proteína prM resulta en la organización de la estructura del virión desde una estructura inicial formada por heterodímeros prM-E a una formada por dímeros de la proteína E. En las vacuolas del pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular (64, 70, 71).

La liberación del virus puede ocurrir por fusión de las membranas de la vesícula exocítica que contiene al virus con la membrana citoplasmática o por efecto citopático a través de rupturas puntuales en la membrana celular (65, 72).

### **I.5-Propiedades físico-químicas del virus dengue.**

La envoltura lipídica del virión del dengue se deriva de lípidos celulares, por lo que las lipasas y los solventes lipídicos provocan la pérdida de la infectividad de las partículas virales (73). El virus se inactiva rápidamente a altas temperaturas. A 50°C la infectividad se reduce un 50% en sólo 10 minutos. La inactivación total del virus en muestras de sangre o en soluciones proteicas ocurre por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Estos también son inactivados por luz ultravioleta y radiaciones gamma. El virus dengue es estable al tratamiento con sacarosa, conservándose a -70°C y liofilizado a 4°C (74).

### **I.6-Propiedades antigénicas.**

La complejidad de la relación antigénica entre los virus del dengue ha sido demostrada utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína E. Estos análisis han mostrado la presencia de determinantes antigénicos de grupo, de complejo y de tipo específico; además especificidad de subgrupos, de subcomplejos, de cepas y de subcepas (75, 76).

## **I.7-Situación Epidemiológica del Dengue.**

### **I.7.1. Situación Epidemiológica Mundial:**

Una pandemia global de dengue comenzó durante la segunda guerra mundial, intensificándose durante la década de los años 60. Desde entonces la prevalencia de FD así como la FHD ha ido en incremento. En la actualidad, aproximadamente 2500 millones de personas se encuentran en riesgo de sufrir la infección por habitar áreas tropicales y subtropicales, así como más de 400 millones de viajeros de Europa y Norteamérica que cada año cruzan las fronteras y regresan a sus países procedentes de Asia, África y América Latina (77, 78).

La prevalencia mundial del dengue se ha incrementado dramáticamente en los últimos años: de 454 casos en los años 50 a 492 820 en los años 90 y hasta 877 888 entre los años 2000–2003. Se calcula que entre 250,000-500,000 personas desarrollan el cuadro severo de la enfermedad anualmente y se estiman valores entre 1-5% de casos fatales (79). Alrededor de 100 países han reportado casos de FD y/o FHD y más de 60 lo hacen regularmente todos los años (80, 81). En lo que va de siglo XXI, el dengue se ha convertido en la enfermedad viral más extendida transmitida por vectores, afectando a millones de personas cada año (82).

En los últimos 40 años se ha observado una dramática extensión del virus dengue en las Américas, con un incremento en el número de epidemias con intervalos cortos entre ellas y un aumento en los casos reportados como DHF/DSS. El número total de casos informados se ha incrementado desde 1 millón en la década de los años 80 hasta más de 6 millones en los últimos 10 años. De 60 casos DHF/DSS reportados por seis países en los años 80, actualmente 30 países reportan una cifra superior a los 165 000. En septiembre del 2010 fueron notificados más de 1 400 000 casos de dengue, incluidos 30 820 casos DHF/DSS y 710 casos fatales (83).

### **I.7.2. Situación Epidemiológica en Cuba:**

En Cuba, en 1977-78 ocurrió una epidemia de FD (causada por el serotipo Den-1). En ese momento dicho serotipo se encontraba circulando en diferentes países de la región, lo que dio lugar a que se produjera una pandemia (84). La FHD fue reportada en las Américas en el año

1981, cuando se presenta una gran epidemia de FHD en Cuba, debido al serotipo Den-2 y en el marco de la cual se reportan 158 personas fallecidas y cerca de 10 000 casos con el cuadro grave de la enfermedad (85).

En 1997 se produce otra gran epidemia de FHD pero circunscrita a la provincia de Santiago de Cuba después de 16 años sin transmisión en el país. Nuevamente el serotipo 2 se presentó con un saldo de 3 012 casos confirmados por el laboratorio y 12 adultos fallecidos. Varios factores favorecieron la reinfestación del *Aedes aegypti* en la provincia y por tanto la reemergencia del virus (86). Esta epidemia fue controlada rápidamente evitando su extensión.

Un pequeño brote fue detectado en la provincia de Ciudad de la Habana con una duración de tres meses en el año 2000, el cual mostró la introducción del serotipo 4 (Den-4) y fueron detectados 138 casos confirmados por el laboratorio (6)

Entre junio del 2001 y marzo del 2002 el dengue fue detectado en un brote limitado nuevamente a la provincia de Ciudad de La Habana, con la circulación del serotipo 3. El sistema de vigilancia identificó 12889 casos confirmados serológicamente, incluyendo 78 con manifestaciones severas de FHD/SCD y tres defunciones (87).

En años posteriores estos eventos fueron pocos documentados, aunque se pudieron identificar dos grandes epidemias en los años 2006 y 2014 afectando varias provincias del país. También la situación epidemiológica se muestra cambiante con la circulación de todos los serotipos virales y con la presencia de más de un serotipo circulando en un mismo brote (1, 88).

### **I.8- Manifestaciones Clínicas.**

El dengue es una enfermedad muy dinámica, a pesar de ser de corta duración (no más de una semana en casi el 90% de los pacientes). Cursa por tres etapas clínicas: la etapa febril (única para la inmensa mayoría de los enfermos), la etapa crítica y la etapa de recuperación. Cada uno de los cuatro serotipos puede causar desde infecciones clínicamente inaparentes hasta formas de la enfermedad potencialmente letales. De acuerdo a las diferentes manifestaciones clínicas la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó el dengue de la siguiente

manera: forma asintomática y forma sintomática (fiebre indiferenciada, Fiebre de Dengue o Dengue Clásico (FD), Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) (grado I y II) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (grado III y IV) (89).

La FD se caracteriza por una enfermedad bifásica benigna, de comienzo abrupto después de un período de incubación que oscila entre 3-15 días, generalmente 8 días. El enfermo presenta fiebre y al menos dos síntomas de los siguientes: cefalea, dolor retroocular, dolores osteomioarticulares, exantema, leucopenia, y algún sangrado. No existen casos fatales de este cuadro y la enfermedad puede resolverse en la segunda semana, aunque los pacientes pueden presentar una convalecencia prolongada con debilidad y depresión (89).

El cuadro clínico de FHD está definido como el de una enfermedad febril aguda. Su periodo de incubación es similar a la FD, así como la presencia de síntomas como: fiebre, artralgia, mialgia, dolores de cabeza y vómitos. Como característica principal de la FHD están las manifestaciones hemorrágicas, que aparecen a los 3-4 días (89).

La variación de los aspectos clínicos se vio dependía de la edad del paciente. La fiebre indiferenciada se observó mayormente en infantes y niños pequeños, y podía estar acompañada de erupción. El síndrome febril benigno o la clásica enfermedad febril aguda, autolimitada, es más común en niños mayores y adultos. La FHD es más frecuente en niños menores de 15 años, donde la fiebre aguda se ha visto asociada con diátesis hemorrágica y una tendencia a desarrollar el SCD, a veces fatal, aunque en las Américas se observa con frecuencia creciente la FHD en el adulto (90). La tasa de casos fatales por FHD/SCD se eleva al 20% en pacientes sin tratamiento, mientras que solo alcanza el 1% en aquellos pacientes bajo tratamiento con suministro de electrolitos, líquidos y oxígeno (91)

En los últimos años ha sido cuestionada la utilidad de esta clasificación, por considerarla rígida, demasiado dependiente de resultados de laboratorio y no inclusiva de enfermos de dengue con otras formas de gravedad, tales como la afectación particular del Sistema Nervioso Central (encefalitis), del corazón (miocarditis) o del hígado (hepatitis grave). Tampoco era útil para el manejo clínico de los enfermos.

Es en este sentido, la nueva clasificación recomendada por la OMS en el 2009, reemplaza los tradicionales cuadros de FD y FHD/SCD. Surge a partir de los resultados del estudio DENCO, que incluyó casi 2000 casos confirmados de dengue, de 8 países y 2 continentes, y establece dos formas de la enfermedad: dengue y dengue grave (figura I.3)(10).



**Figura I. 3. Clasificación Clínica de Dengue (Guía de la OMS 2010).**

Los criterios para la nueva clasificación del dengue severo son: extravasación severa de plasma, expresada en Choque Hipovolémico, y/o dificultad respiratoria debido al exceso de líquidos acumulados en el pulmón, hemorragias severas, según criterio médico tratante, y por último, la afectación de órganos: hepatitis severa por dengue (transaminasas superiores a 1000 unidades), encefalitis por dengue o la miocarditis por dengue (10).

En el marco de este estudio se detectaron algunos signos y síntomas presentes en los enfermos un día antes de agravar, permitiendo identificar tempranamente aquel enfermo que va a evolucionar a un cuadro severo y en consecuencia tratar de manera precoz al paciente mediante el tratamiento con reposición de líquidos por vía intravenosa, mejorando su

pronóstico. El dolor abdominal o el dolor referido a la palpación de abdomen fue un factor de riesgo significativo para adultos y niños, así como el sangramiento de mucosas y la trombocitopenia menor de 10.000 por milímetro cúbico. En el adulto, otros signos de alarma fueron la letargia, entendida como somnolencia y a veces alternando con irritabilidad, la hipoalbuminemia y el hematocrito elevado (92).

En conclusión, la nueva guía muestra mejoras en un reconocimiento temprano de los signos de alarma, alertando a los clínicos en cuanto al pronóstico del paciente, estableciendo un adecuado triage y un mejor manejo de decisiones (93). Algunos estudios muestran un incremento en la sensibilidad para la identificación de los casos severos mediante esta nueva clasificación (94, 95) .

### **I.9-Patogenia.**

Los mecanismos implicados en la patogenia de la enfermedad no están totalmente esclarecidos. En este sentido se han planteado varias hipótesis que tratan de explicar la aparición de la forma severa de la enfermedad.

La hipótesis propuesta por Halstead en 1970 plantea que la FHD/SCD ocurre en aquellos individuos que ya tienen anticuerpos contra algún serotipo del virus dengue, los que en presencia de un segundo serotipo infectante forman complejos inmunes (anticuerpos del primer serotipo reconocen partículas virales del segundo serotipo) que provocan se desencadenen una serie de procesos en los que participan activamente los monocitos y que concluyen con el aumento de la permeabilidad vascular y otras alteraciones que se observan en el dengue hemorrágico (96). Este mecanismo se conoce como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA). Una vez que los primeros complejos inmunes han penetrado al monocito y la replicación viral ha comenzado, se generan señales intracelulares que incrementan la expresión de receptores Fc, con el consiguiente incremento de la replicación viral (lazo infección-expresión Fc- infección subsiguiente) (97, 98). Se ha observado, que la secuencia de infección de Den-1 seguida por Den-2 está asociada con una alta mortalidad y morbilidad; también se ha observado en la secuencia Den-1 y Den-3 (5, 99, 100).

Un segundo aspecto de la patogenia del dengue es la marcada activación de los linfocitos T y la inducción de reactividad cruzada a células T CD4+ y células T CD8+ citotóxicas, que reconocen a los antígenos virales del virus del dengue (principalmente proteínas no estructurales) en monocitos infectados (98, 101). El resultado de este proceso puede traer consecuencias patológicas en los pacientes, debido a la liberación de citoquinas con propiedades vasoactivas y procoagulantes (interleuquinas, factor de necrosis tumoral, factor activador de plaquetas y uroquinas), la activación del complemento y la liberación de interferón gamma (102, 103).

Otra hipótesis es la propuesta por Rosen, 1977 donde plantea que la virulencia de las distintas cepas de los cuatro serotipos del virus puede aumentar cuando estos pasan repetidamente por el hospedero humano (98). De esta forma, las cepas más virulentas serían las responsables de los síntomas graves que se observan en la FHD/SCD. La virulencia de ciertas variantes virales pudiera estar ligada a un determinismo genético; donde una mutación de una región precisa del gen de la proteína E, asegura la atenuación o la reversión a la virulencia de una especie dada. Se asocia de esta forma la aparición de cuadros graves con determinadas cepas virales o mutantes de estas.

Otras dos hipótesis relacionadas con el agente viral han sido planteadas para explicar la patogenia de la FHD/SCD, en las cuales se refieren cambios observados en la estructura del virus. Una primera donde se muestran diferencias en el genoma del virus dengue 2, para las proteínas prM, E, NS4b y NS5 y regiones no codificantes del genoma viral (UTR, del inglés UnTranslated Regions) como determinantes primarios para el desarrollo de FHD (104); y una segunda hipótesis donde se plantea la selección de mutantes de escape a la neutralización, que en el caso del virus del dengue se debe a la presencia de anticuerpos neutralizantes heterólogos después de la infección primaria y que juegan un papel importante durante la infección secundaria (105).

Por último, la hipótesis más aceptada es la integral planteada por Kourí y cols (1987) (106) y Guzmán y col (2008) (107). En ella se relacionan factores de riesgo del individuo como: la existencia de anticuerpos contra el virus dengue, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma y la diabetes; factores de riesgo epidemiológicos relacionados con el

vector como capacidad de ser infectante, alta densidad, el intervalo entre ambas infecciones, la amplia circulación viral y por ultimo factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. La presencia o ausencia de estos factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales hacen posible que ocurra o no una epidemia de FHD/SCD de dengue.

## **I.10- Respuesta Inmunitaria.**

### **I.10.1-Inmunidad innata y adaptativa:**

La respuesta inmune innata o inespecífica y la adaptativa o específica, juegan un rol fundamental en la respuesta antiviral. Los componentes celulares de la inmunidad innata más importantes en la respuesta antiviral son principalmente las células dendríticas (CD), las células asesinas naturales (NK, del inglés natural killer) y los macrófagos (M ), los cuales controlan la fase inicial de la infección viral. La participación conjunta de estos tipos celulares con los componentes humorales del sistema innato como el sistema complemento, el papel inmunorregulador de los interferones y otras citoquinas, como TNF- , interleuquina-6 (IL-6), IL-10 e IL-8, permiten el desencadenamiento de la respuesta adaptativa antiviral (108). Los antígenos capturados, son procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno (APC) que migran a los órganos linfoides secundarios donde ocurre la activación de los L T vírgenes, los cuales se diferencian a linfocitos T colaboradores, Th1 y Th2 (Th del Inglés, T helper) que intervienen en los mecanismos de la inmunidad adaptativa y en la formación de clones de células B específicas productoras de anticuerpos. La síntesis excesiva de citoquinas produce un aumento de la permeabilidad vascular que se traduce en una extravasación de plasma, que es la alteración fisiopatológica fundamental del dengue, mediante la cual se fuga agua y proteínas hacia el espacio extracelular y se produce la hemoconcentración y a veces choque hipovolémico (109).

La infección viral induce apoptosis de linfocitos T en los primeros días de la infección que de acuerdo a su intensidad puede influir favorablemente en la desaparición del virus o puede provocar la lisis de grandes cantidades de esas células y disminuir transitoriamente la competencia inmunológica del paciente, así como provocar daños en otras células y tejidos del

huésped, tales como los endotelios, hepatocitos, miocardiocitos, neuronas, células tubulares renales y otras, lo cual podría explicar la afectación de muchos órganos durante esta infección (110).

### **I.10.2-Respuesta humoral de anticuerpos:**

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs) forman un grupo de glicoproteínas presentes en el suero y otros fluidos, cuya producción es inducida cuando el sistema linfóide del individuo se pone en contacto con una estructura desconocida, el antígeno. La función de los anticuerpos es reconocer esos elementos invasores, unirse a ellos, e iniciar así el proceso que lleva a su eliminación. Las clases de inmunoglobulinas, difieren en tamaño, carga eléctrica, composición de aminoácidos y azúcares, cada una con características, propiedades y funciones particulares (111).

Todas las inmunoglobulinas reconocen algún antígeno en forma específica pero se diferencian en cuanto a su localización tisular, reactividad con otras proteínas, etcétera. Las inmunoglobulinas poseen distintas estructuras, pero todas ellas responden a un monómero básico de cuatro cadenas. Una molécula de anticuerpo está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H, del inglés Heavy) idénticas entre sí y dos livianas (L, de Light) también idénticas entre sí. Las cadenas pesadas se encuentran unidas por puentes disulfuro (-S-S-) de la misma manera se unen, a cada una de ellas, cada una de las cadenas livianas. La proteína tiene forma de Y, cada brazo de la Y, designado fragmento Fab (de antigen binding Fragment), une el antígeno en forma independiente, o sea que el anticuerpo es bivalente. El resto de la molécula, o fragmento Fc (porque cristaliza con facilidad) no participa en la unión con el antígeno sino que es reconocido por receptores celulares específicos, y contribuye a la efectividad del proceso mediante el cual ese antígeno es destruido (111).

Los anticuerpos antiviral median tres funciones fundamentales en la eliminación de las partículas virales infectantes: la neutralización del virus, la histólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las células B, en la medida que se activan y proliferan, son capaces de capturar y procesar antígenos virales para presentarlos a las células T, incrementando el número de estas células activadas (112).

En la infección por dengue, los anticuerpos de tipo IgM e IgG son considerados los de mayor importancia desde el punto de vista de protección o inmunopatogenia, aunque en años recientes se han realizado varios estudios relacionados con los anticuerpos IgA e IgE valorando su posible papel en la respuesta inmune (21, 113, 114).

Los anticuerpos contra el virus dengue o sus proteínas, usualmente actúan para prevenir o controlar la infección, esta respuesta puede ser primaria o secundaria. La respuesta secundaria es marcadamente diferente a la primaria. La respuesta secundaria heterotípica ocurre cuando el hospedero ha sido inmunizado (por infección o vacunación) por otro serotipo de dengue o por otro flavivirus fuera del complejo dengue. La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo (115).

En infecciones primarias a dengue, la inmunoglobulina M es la primera que aparece y se hace detectable a partir del 5to día de comienzo de la fiebre. Los mayores niveles son alcanzados en las 2 semanas siguientes y disminuyen posteriormente entre los 2 y 3 meses de inicio de los síntomas, aunque en algunos individuos se ha observado niveles de anticuerpos IgM con más duración (114, 116).

En las infecciones secundarias, la cinética de la respuesta de IgM es más variada. Se plantea que generalmente aparece tarde durante la fase febril de la enfermedad, frecuentemente precedida por la IgG, siendo menores los niveles de IgM a los obtenidos en los casos primarios. Se ha señalado que en un número limitado de pacientes, esta inmunoglobulina no es detectada (116). Sin embargo, en estudios recientes no se ha observado diferencia en la respuesta de anticuerpos IgM al compararse casos de FD primarios y secundarios (114, 117).

La respuesta de anticuerpos IgG es baja en las infecciones primarias, comenzando a detectarse después de la primera semana de comenzados los síntomas y alcanzando los máximos valores entre 14 y 21 días después. Para infecciones secundarias, los niveles de anticuerpos IgG son detectados en la fase temprana de la enfermedad y se elevan rápidamente (118).

Otro de los marcadores serológicos propuestos para el diagnóstico del dengue e indicativo de una infección reciente, ha sido la detección de IgA en muestras de suero de individuos con

infección a virus dengue (21, 22, 119). Se plantea que la IgA tiene un tiempo de vida media más corto que la IgM, por lo que esta inmunoglobulina pudiera constituir un marcador serológico de mayor utilidad, en el diagnóstico de infecciones recientes en países endémicos donde circulen más de un serotipo y por otro lado, proveer una mejor información sobre la progresión de una epidemia (21, 22).

### **I.11- Diagnóstico de Laboratorio.**

La infección por virus dengue es detectada por el uso de diferentes pruebas biológicas: aislamiento viral en células de mosquitos (75); detección del ARN viral mediante la técnica de PCR (120, 121); o pruebas serológicas, como los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida conocidos como ELISA para la detección de anticuerpos IgM e IgG (122, 123). La técnica del PCR es costosa y se hace engorrosa su implementación para muchos laboratorios. El MAC-ELISA es una técnica fiable pero sólo puede brindar un diagnóstico de la enfermedad transcurrido 5 días después del comienzo de los síntomas, que es cuando se hacen detectables los anticuerpos IgM en el suero de los pacientes infectados con virus dengue (80).

Las dificultades que se presentan en el diagnóstico virológico y serológico del dengue ha hecho necesario la búsqueda de métodos que sean económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y sobre todo que permitan dar un diagnóstico temprano de la enfermedad.

#### **I.11.1-Diagnóstico Viroológico:**

Aislamiento viral e identificación.

**Aislamiento viral en ratones:** los dos métodos tradicionales de aislamiento del virus dengue son la inoculación en ratones recién nacidos y de cultivos celulares. Estos agentes pueden infectar a los ratones por diferentes vías de inoculación, intracerebral, intraperitoneal y subcutánea, pero la más sensible es la intracerebral (124)

**Aislamiento viral en cultivos de células de mamíferos y mosquitos:** la aplicación de los cultivos celulares en el aislamiento del virus dengue ha tenido como consecuencia un

incremento en la sensibilidad, aunque hasta el presente no existe un sistema de células de mamífero o mosquitos que sea capaz de inducir la producción de efecto citopático (ECP) de todas las cepas virales. La línea celular LLCMK2 (riñón de mono) es la más sensible entre las líneas de células de mamífero, aunque esta sensibilidad varía en dependencia del serotipo y de las cepas virales. Otras líneas de células de mamífero como las Vero (riñón de mono) y BHK21 (riñón de hámster) también han sido empleadas con éxito. Las células más utilizadas en la actualidad son las células de mosquito C6/36 obtenidas de *Aedes albopictus* y las de *Aedes pseudoscutellaris* (AP61), por su sensibilidad para el aislamiento viral (76).

### **I.11.2-Diagnóstico Molecular:**

La biología molecular ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico con la utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR, la que permite una amplificación del ARN viral, brindando rapidez, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (120). Se han utilizado diferentes modalidades como: RT-PCR, NESTED PCR y SEMINESTED PCR. También se han empleado los procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos con el uso de sondas no radioactivas (115, 125). Actualmente se le ha dado un importante valor al PCR-TR, el cual permite cuantificar la carga viral, contribuyendo por tanto no sólo al diagnóstico sino también al conocimiento de la patogénesis del dengue (126, 127). A pesar de lo novedoso y rápido de estos métodos, no son ampliamente utilizados en todos los laboratorios que realizan el diagnóstico debido a su alto costo.

### **I.11.3-Detección del antígeno:**

La búsqueda de sistemas diagnósticos que permitan dar una respuesta temprana y que sean rápidos, fáciles de ejecutar y que puedan sustituir a los métodos moleculares ha dado lugar al desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos, los cuales constituyen variantes para la detección de antígenos virales, dirigidos fundamentalmente a la detección de la proteína E (128, 129). Se ha encontrado una baja sensibilidad de estos sistemas, lo cual pudiera deberse a la poca concentración del virus presente en las muestras de suero o a la posibilidad de formación de inmunocomplejos. Se han realizado algunos estudios para mejorar la sensibilidad, con la ayuda de combinaciones como la estreptavidina-biotina o con el uso de sustratos fluorescentes

(130, 131), sin embargo hasta la actualidad no son de amplio uso para el diagnóstico del dengue.

La detección inmunohistoquímica de virus dengue en muestras de tejidos tomados en biopsias o autopsias ha sido muy útil en estudios patológicos, ya que se han encontrado evidencias de que permite la confirmación de la etiología del virus dengue. Se ha realizado la detección de antígenos de virus dengue congelados o fijados en tejidos, empleando la tinción con inmunoperoxidasa y el uso de anticuerpos policlonales (AcP) y monoclonales (AcM) serotipo específico (132-134).

En la actualidad se ha valorado la posibilidad de detectar la proteína viral NS1 como un posible marcador de infección temprana, así como su papel en la etiopatogenia de la enfermedad (135, 136). Varios sistemas comerciales y no comerciales, tanto en formato de ELISA como de pruebas rápidas han sido desarrollados para su detección, siendo sometidos a diferentes evaluaciones por los laboratorios de referencias en las diferentes regiones (137-139).

#### **I.11.4-Diagnóstico Serológico:**

El diagnóstico serológico del dengue es complicado debido a los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los cuatro serotipos del virus dengue y los flavivirus en general. Sin embargo, teniendo en cuenta los elevados niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan una infección secundaria, el estudio de monoseros tomados en la fase aguda o en la convaleciente temprana puede ser de utilidad como criterio de caso probable o presuntivo de dengue (140).

Debe tenerse en cuenta para el diagnóstico serológico de dengue los dos tipos de infecciones que fundamentalmente aparecen en los individuos que tienen contacto con algún serotipo del complejo: la infección primaria y la secundaria. Como ha sido mencionado anteriormente, la infección primaria es aquella en donde los individuos son infectados por primera vez por uno de los serotipos virales. La infección secundaria ocurre en aquellos individuos que se ponen nuevamente en contacto con el virus, pero en este caso con un serotipo diferente al que

provocó la primera infección (141). También existe la posibilidad que se produzcan infecciones terciarias y cuaternarias debido a la existencia de los cuatro serotipos virales.

La mayoría de las técnicas serológicas pueden ser utilizadas para el diagnóstico del virus dengue. La técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) ha sido empleada por la capacidad que tiene el virus dengue de aglutinar eritrocitos de ganso. Esta es utilizada en el estudio serológico de monoseros y pares de sueros, donde son empleados comúnmente antígenos de los cuatro serotipos, producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa acetona (142). Una seroconversión o incremento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos hemaglutinantes en un par de sueros, es criterio diagnóstico para una infección reciente por flavivirus. Por otra parte, títulos de anticuerpos hemaglutinantes 2560 es el criterio más ampliamente utilizado para clasificar un caso como secundario. Finalmente, títulos elevados ( 1280) en monoseros, es criterio de infección probable por dengue (143).

Otro de los métodos serológicos utilizados es la prueba de neutralización por reducción de placas (PNRP). Este ensayo permite la detección de anticuerpos neutralizantes al virus y es muy empleado en estudios seroepidemiológicos debido a su elevada especificidad, permitiendo identificar el serotipo causante de una infección pasada (4). Se ha demostrado que en un individuo con una infección secundaria el título de anticuerpos neutralizantes al primer serotipo que produjo la infección es anamnesticamente mayor que contra el serotipo infectante durante la segunda infección (“fenómeno del pecado original”) (144),

Tanto la IH como la PNRP requieren de muestras de sueros pareados en los casos sospechosos de la enfermedad, así como destreza y tiempo para su ejecución, por lo que no son actualmente utilizados como métodos de rutina en el diagnóstico.

Sistemas más económicos, específicos, sensibles y eficaces son los ELISA. Los mismos son rápidos, fáciles de ejecutar y muestran a su vez elevada especificidad cruzada, lo que los hace de gran utilidad tanto para el diagnóstico como para estudios sero-epidemiológicos (122, 145).

El MAC-ELISA, constituye uno de los sistemas más importantes y útiles del diagnóstico y la vigilancia del dengue. La presencia de estos anticuerpos en suero, es indicativa de una infección activa o reciente por dengue. Diferentes sistemas han sido desarrollados con diferentes grados de sensibilidad y especificidad (122, 146, 147). Tanto sueros como muestras de sangre colectadas en papel de filtro pueden utilizarse mostrando niveles de sensibilidad y especificidad comparables. Algunos investigadores han aplicado el principio del MAC-ELISA para la detección de anticuerpos IgA (AAC-ELISA) e IgE (AEC-ELISA) anti-dengue (113, 148), mostrando utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad. También se han desarrollado sistemas ELISAs para la detección de anticuerpos IgG (149-151). En 1989 fue publicado por Vázquez y Fernández un ELISA de inhibición que permite la detección y titulación de IgG anti-dengue tanto en suero como en muestras de sangre colectadas en papel de filtro y ha sido exitosamente aplicado durante años a la vigilancia y estudios serológicos de dengue en Cuba y en otros países (16, 86, 152).

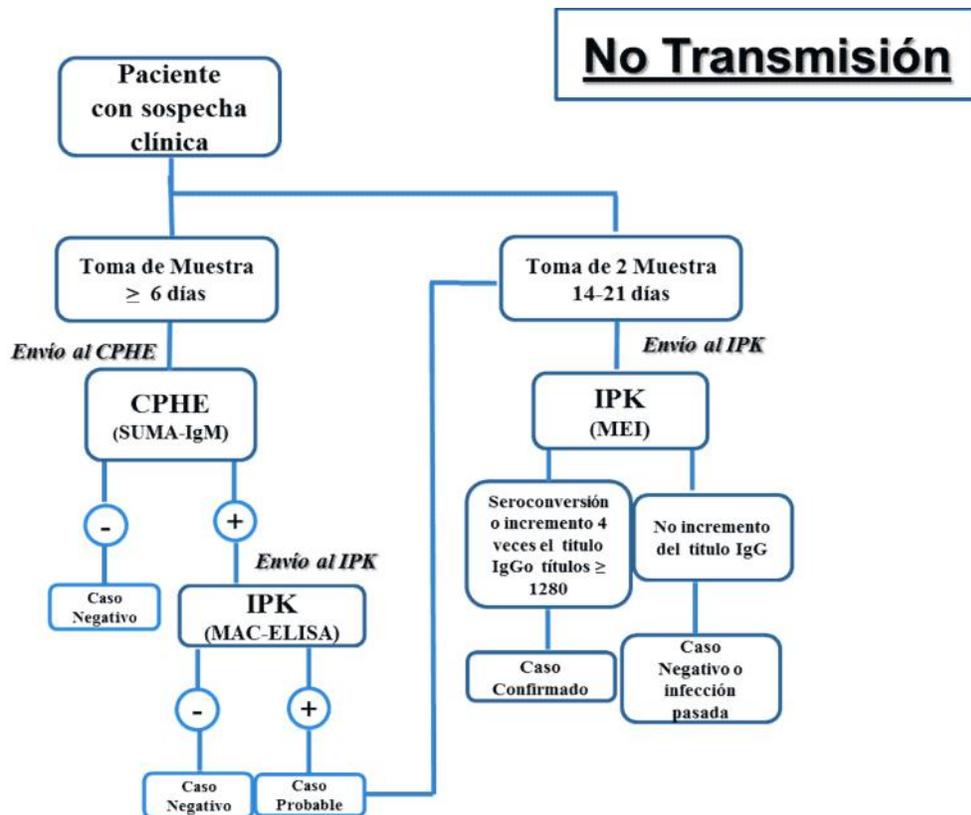
Otros métodos de detección de anticuerpos anti-dengue han sido desarrollados con el empleo de marcadores no enzimáticos, entre ellos se encuentra el sistema inmunocromatográfico PanBio, que permite la detección de anticuerpos IgM e IgG en menos de cinco minutos (153, 154) y el sistema denominado AuBio Dot dengue IgM, que utiliza marcadores de oro coloidal y amplificación con iones plata (155)

En la actualidad existe un gran número de sistemas comerciales para la detección de anticuerpos IgM a dengue (156) que están siendo utilizados por muchos laboratorios. Asegurar la calidad y desarrollo de los sistemas comerciales disponibles es un requerimiento global, haciéndose cada día más importante por el incremento reciente de productos diagnósticos. La venta de estos en el mercado sin contar con procedimientos de monitoreos regulatorios y licencia efectiva, es una causa de preocupación y atención necesaria para garantizar el diagnóstico.

#### **I.11.5. Algoritmo diagnóstico actual para la infección por virus dengue en Cuba:**

El algoritmo diagnóstico establecido para la vigilancia de dengue en Cuba trabaja bajo los criterios de periodos de no transmisión y de transmisión de la enfermedad.

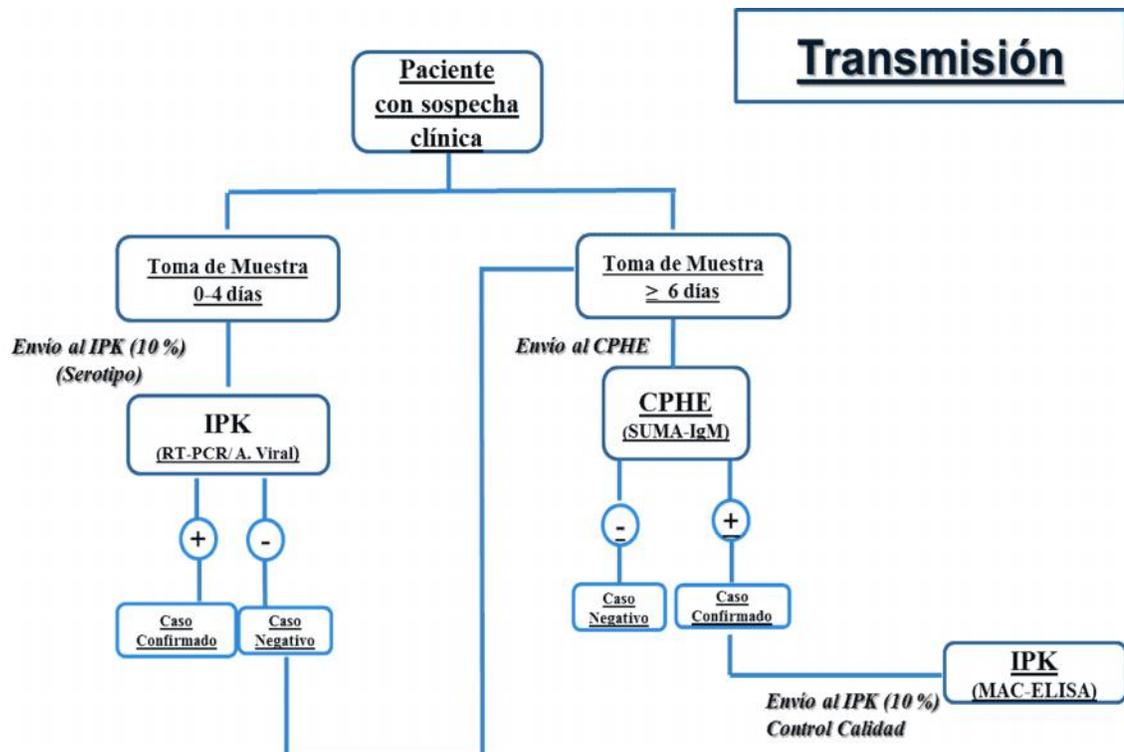
En periodos de **no transmisión** el algoritmo que se establece es el serológico y como se muestra en la figura I.4:



**Figura I. 4. Algoritmo diagnóstico actual de la vigilancia serológica de laboratorio de dengue en Cuba, en el periodo de no transmisión.**

La primera muestra de suero es colectada al día 6 de inicio de los síntomas, si es positiva a IgM por el sistema SUMA-IgM es enviada al IPK y procesada mediante el ELISA de IgM. Una muestra positiva a IgM se considera un caso sospechoso de dengue. Una segunda muestra de suero es colectada entre los 14 y 21 días posteriores a la primera colecta realizándose la titulación a punto final de los anticuerpos IgG en el par de sueros mediante el MEI. La presencia de una seroconversión o incremento del título de anticuerpos o títulos iguales o superiores a 1280, es considerado un caso confirmado de dengue definiéndose además el tipo de infección: primaria o secundaria.

Los ensayos moleculares de A. Viral y RT-PCR permiten la confirmación de un caso en la fase aguda de la enfermedad y se trabajan principalmente con dos objetivos: la determinación del serotipo(s) circulante(s) durante una epidemia o transmisión y la confirmación del diagnóstico en casos graves y fallecidos. Durante el **periodo de transmisión** estos comienzan a jugar su papel estableciéndose el algoritmo como se muestra en la figura I.5.



**Figura I. 5. Algoritmo diagnóstico actual de la vigilancia de laboratorio de dengue en Cuba, en el periodo transmisión.**

Es importante señalar que en **periodo de transmisión** el LNR-IPK procesa todos los casos graves que se presentan durante el brote. Por otra parte a medida que avanza el evento epidemiológico se establece el procesamiento de 10 muestras mensuales por provincias mediante AViral y RT- PCR para la detección del serotipo viral, además del procesamiento mediante el ensayo serológico MAC-ELISA del 10 % de los casos IgM positivos por el SUMA-IgM procedentes de los CPHEM como control de calidad de la prueba.

### **I.12- Utilidad de los métodos diagnósticos para la investigación.**

Una amplia variedad de métodos diagnósticos están disponibles en la actualidad para el diagnóstico de las diferentes infecciones virales y las investigaciones básicas correspondientes que evalúan la respuesta de los distintos marcadores de la enfermedad tanto en modelos animales como en el humano.

Durante la fase febril aguda, el diagnóstico puede ser definido por el aislamiento viral, detección del genoma o de antígenos virales de la muestra. El aislamiento puede realizarse mediante la inoculación del mosquito o cultivos celulares. También puede utilizarse la inoculación intracerebral de ratones (157). El virus puede ser recuperado de muestras de suero, plasma, sangre total o tejidos seleccionados de autopsia. La inoculación del mosquito es el método de aislamiento más sensible, pero no es utilizado como diagnóstico rutinario debido a los requerimientos especializados y alto costo de mantenimiento (158). Los cultivos celulares tienen un amplio uso con preferencia de las líneas celulares de mosquito C6/36 o AP61 (10, 157). Otras líneas menos sensibles incluyen cultivos de mamíferos como Vero, LLC-MK2, y BHK-21. Una de las grandes utilidades del aislamiento es la caracterización del virus aislado mediante estudios *in vitro* como: secuenciación genómica, neutralización viral y estudios de infección (158). Aunque en la práctica el aislamiento es altamente específico tiene su principal propósito para la vigilancia epidemiológica de las arbovirosis y no el diagnóstico habitual. Un reciente avance en el aislamiento viral fue descrito por Patramool y col (2013) quienes usaron esferas magnéticas cubiertas con un polímero aniónico para la detección DENV y CHIKV (159), método que pudiera proveer una estrategia útil para el monitoreo del estado de los mosquitos circulantes en las regiones y el riesgo de aparición brotes de las arbovirosis transmitidas por ellos.

Por otra parte, las técnicas de detección del ácido nucleico viral se llevan a cabo en muestras agudas, ofreciendo una mejor sensibilidad con un tiempo mucho más rápido de desarrollo. El ácido nucleico viral puede ser detectado durante unos días adicionales, más allá del período de viremia y mediante los métodos de RT-PCR, PCR-TR y la amplificación isotérmica. Todos estos métodos involucran tres pasos básicos: extracción del ARN viral, amplificación, y detección y caracterización del producto amplificado (126). Hay una amplia variedad de

muestras que pueden ser procesadas por el PCR donde incluye sangre, suero, plasma, y tejidos fijados en parafina. Para la infección por virus dengue las muestras de orina y la saliva han sido estudiadas para el diagnóstico (160, 161). La orina procesada por el PCR-TR proporciona una ventana más grande para la detección viral pasado el período del viremia. El RNA para el virus dengue puede ser detectado en orina hasta un día 16 de inicio de los síntomas comparado a un día 8 en muestras de sangre (161). La combinación de RT-PCR/nested PCR ha demostrado ser eficaz para la detección específica y el genotipaje viral. No obstante el PCR-TR en relación al PCR convencional, es una metodología más rápida, de baja contaminación, elevada sensibilidad y especificidad y que eventualmente puede remplazar al aislamiento y el RT-PCR como mejor ensayo de referencia para el diagnóstico rápido en muestras agudas (162). Este puede apoyarse en las sondas moleculares (SYBR-Green) y las de hibridación (Taq-Man) y permite medir múltiples RNA/DNA en una misma muestra. De esa manera, presenta disímiles aplicaciones como en el diagnóstico, epidemiología viral, patogénesis y monitoreo de tratamientos, especialmente en aquellos virus altamente mutables donde provee un pronóstico clínico para el manejo de los pacientes (163). La amplificación isotermal (LAMP del inglés: Loop-mediated isothermal amplification) es un método de amplificación de DNA que puede combinarse con el RT-PCR para la detección de RNA. Es un método rápido y específico que utiliza 6 primers diferentes que reconocen 8 regiones distintas del gen diana. Entre sus ventajas se encuentra su desarrollo a una temperatura constante (60-65°C) por lo que no requiere de termociclador y todo ocurre en una sola reacción con una elevada sensibilidad de detección(164). Por su rapidez y sensibilidad este método sería extremadamente útil en la toma de medidas de acción rápida, incluyendo el manejo temprano del paciente (164).

La detección de antígenos virales es otra metodología disponible para el diagnóstico de los Arbovirus. La proteína no estructural 1 (NS1) es una glicoproteína altamente conservada, producida durante el proceso de multiplicación viral y en su forma soluble se acumula en altas concentraciones en el suero de pacientes, independientemente del tipo de infección primaria o secundaria (24, 25, 136). Varios sistemas se han desarrollado para la determinación de esta proteína y han sido aplicados no solo para el diagnóstico, sino para la evaluación de la cinética de la NS1 en sangre, su relación con la multiplicación viral asociada a la gravedad en la infección por virus dengue y vinculadas con otras metodologías moleculares se han podido

identificar diferencias entre las proteínas expresadas para los diferentes Arbovirus (51, 137, 139, 165). Aunque el suero constituye la muestra más común a utilizar, otras como la orina y la saliva han sido estudiadas en pacientes agudos con infección por virus dengue (166). También ha sido detectada en fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con síntomas neurológicos (167) y en tejidos de casos fatales de dengue (168, 169).

Después del período de viremia, la mejor estrategia de diagnóstico sería la detección de los anticuerpos, lo que es indicativo de una respuesta inmunológica del hospedero frente al virus infectante. Sin embargo, la gran desventaja de estos métodos es que los individuos residentes en áreas endémicas con circulación de varios arbovirus, frecuentemente presentan niveles inmunológicos a estos, contribuyendo a una respuesta cruzada de anticuerpos que no permite la definición del agente infectante (12). Entre los métodos serológicos incluyen los ELISA, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), IH y la PNRP. Estos métodos son comúnmente empleados para la detección de anticuerpos IgM e IgG, y para este último se utilizan generalmente pares de sueros para lograr una confirmación serológica del caso. Para la infección por virus dengue los patrones de respuesta de estos anticuerpos difieren entre la infección primaria y secundaria (15, 116, 170). Los ensayos IH y PNRP actualmente no son muy utilizados como métodos diagnósticos de rutina por la complejidad de los procedimientos, pero son aplicados en estudios seroepidemiológicos. Por otra parte estos ensayos serológicos pudieran ser aplicados en estudios de evaluación de inmunógenos vacunales, en el seguimiento de la respuesta humoral presentada ante la inoculación, inclusive la caracterización de la respuesta neutralizante generada ante tales candidatos (171, 172).

*CAPÍTULO II:*

*MATERIALES Y MÉTODOS*

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Diseño general de la investigación:

El presente trabajo es un estudio experimental donde se evaluaron los indicadores de desempeño de cuatro sistemas comerciales y no comerciales para la detección de la proteína viral NS1 y los anticuerpos IgA a virus dengue, para su posible inclusión en una nueva propuesta de algoritmo diagnóstico de la enfermedad en el país. Además se valoró el comportamiento de estos marcadores en la fase aguda de la infección, en relación con diferentes variables para la confirmación temprana del caso y la definición del tipo de infección primaria o secundaria.

Para el estudio de la NS1 y los anticuerpos IgA antidengue como marcadores diagnósticos de la infección temprana por dengue, fueron colectadas muestras de suero de pacientes con sospecha clínica, procedentes del Hospital “Salvador Allende” y del IPK, en el periodo comprendido del 2010 al 2014. Todas las muestras fueron procesadas por los ensayos de referencia molecular y serológicos establecidos por la vigilancia para la confirmación de los casos de dengue.

Estos ensayos de referencia fueron desarrollados por el LNR-IPK. Una primera muestra tomada entre los días 0 y 4 del comienzo de los síntomas fue procesada mediante el ensayo molecular de PCR-TR el cual permitió la confirmación del caso y la identificación del serotipo viral infectante. La segunda muestra colectada con cinco días o más del comienzo de los síntomas, fue procesada inicialmente por el ensayo serológico SUMA-IgM en el CPHEM y luego tuvo una confirmación serológica mediante los ensayos MAC-ELISA y MEI, en el LNR-IPK, los cuales también permitieron una confirmación del caso, además de la definición del tipo de infección primaria o secundaria.

Todas las muestras negativas a dengue utilizadas en el estudio fueron también colectadas en el periodo comprendido del 2010 al 2014 y procesadas por las técnicas serológicas de referencia.

## II.2. Universo de estudio para la evaluación de la proteína viral NS1.

Como parte de los objetivos del presente trabajo, los sistemas comerciales Platelia NS1 y SD Duo fueron utilizados para la evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico de la infección temprana por virus dengue. Un total de 934 muestras de suero fueron procesadas por estos ensayos, las cuales habían sido conservadas a -20 °C hasta su utilización. Los sueros agrupados en cada panel se seleccionaron en función de los resultados obtenidos previamente por los ensayos de referencia PCR-TR y serología IgM/IgG.

Para el estudio de los indicadores de desempeño de los sistemas comerciales en evaluación (**objetivo 1**) se confeccionaron 2 paneles:

**Panel 1:** 252 muestras de suero colectadas entre los días 0 y 4 de inicio de los síntomas, procedentes de pacientes que fueron hospitalizados con un diagnóstico clínico de infección por virus dengue. De ellas, 218 fueron confirmadas por el PCR-TR y las 34 restantes por IgM/IgG. Los casos fueron clasificados según el tipo de infección en 119 con infección primaria y 133 con infección secundaria.

**Panel 2:** 150 muestras de suero negativas a dengue. De ellas 70 correspondían a sueros de pacientes con patologías virales confirmadas y no relacionadas con dengue como: 10 sueros positivos de la vigilancia a los virus de Rubeola y Sarampión, 20 sueros positivos a Virus Sincitial Respiratorio (VSR), 20 sueros positivos a virus de Hepatitis A y 20 sueros positivos a virus de Influenza. Todas las muestras fueron colectadas en la fase aguda de la infección y procedían de los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNRs) para infecciones virales del IPK. Los 80 sueros restantes correspondieron a donantes de sangre supuestamente sanos.

Para el estudio de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico temprano en relación al momento de colecta de la muestra, tipo de infección y sensibilidad al serotipo viral infectante (**objetivo 2**), también fue utilizado el **panel 1** y se confeccionó un **panel 3**, evaluando el comportamiento de esta proteína en muestras colectadas con cinco días o más de inicio de los síntomas:

**Panel 3:** 532 muestras de suero colectadas entre los días 5 y 54 de inicio de los síntomas, procedentes de pacientes con una infección confirmada serológicamente (IgM/IgG) a virus dengue. Los casos fueron clasificados en 213 con infección primaria y 319 con infección secundaria. En el estudio, cada uno de los sistemas comerciales para la detección de la NS1 evaluó 266 muestras de suero.

**II.3. Método ELISA de doble anticuerpo para la detección de la proteína NS1 del virus dengue en suero: Sistema Comercial Platelia Dengue NS1 Antigen (Platelia NS1)**

El sistema comercial Platelia NS1 (**BioRad, France**) se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de comenzar el procedimiento, se estableció la distribución e identificación de las muestras de los pacientes, así como los controles positivos, negativos y el calibrador del ensayo, como se muestra en el siguiente protocolo (figura II.1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S5										
B	R4	S6										
C	R4	S7										
D	R5	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

**Figura II. 1. Protocolo para la distribución de las muestras de suero y controles del ensayo. R3: Control negativo, R4: Calibrador, R5: Control positivo, SN: Muestras de suero enumeradas consecutivamente.**

Dispuesto dicho protocolo, se realizó el procedimiento de dispensado de los reactivos de la siguiente manera: primeramente sobre la placa sensibilizada con AcM anti- NS1 se depositaron 50 µL del diluyente de muestra (tampón fosfato, Tween 20, suero de ternera fetal (STF), Proclin 300 al 0.15%), seguido de 50 µL de los sueros de los pacientes y controles del ensayo (R3, R5 y duplicados de R4) y por último 100 µL de conjugado anti-NS1-peroxidasa en dilución de 1/50. La superficie de la microplaca se cubrió con una película adhesiva para

evitar la pérdida de volumen por sequedad durante la incubación de 90 minutos a una temperatura de 37°C, en cámara húmeda. Al finalizar la incubación, se retiró la película adhesiva sobre la placa y se realizaron 6 lavados con una solución tamponada (Tris-NaCl (pH 7.4), 1% Tween 20, 0.01% Proclin 300), proporcionada por el estuche. La microplaca fue secada sobre una hoja de papel absorbente. En el paso siguiente se adicionaron 160µL de la solución cromógena reveladora conteniendo 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), solución fosfato-citrato (pH=5,2), peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0.015% y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%. Se incubó a temperatura ambiente (TA), protegida de la luz, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 µL de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1N) y se procedió a la lectura de la microplaca mediante un lector de ELISA (Dynex Technologies) a una longitud de onda de 450 nm y con filtro de referencia de 620 nm.

Cálculo e interpretación de los resultados.

Se consideró como valor de corte (CO) a la media aritmética de las densidades ópticas (DOs) de las réplicas del calibrador.

**Cálculo de la relación muestra:** los resultados se expresaron en forma de relación con la ayuda de la formula siguiente: Relación Muestra = S/CO, donde S es la DO obtenida para la muestra. El término de relación muestra se definió para este estudio como R<sub>DO</sub>.

**Control de la calidad:** Según el fabricante, para que la prueba fuera considerada válida, debieron cumplirse los siguientes criterios: Valor de CO>0.2, para la relación de los controles negativos R (DO negativos)/CO <0.4 y para relación de los controles positivos R (DO positivos)/CO >1.5.

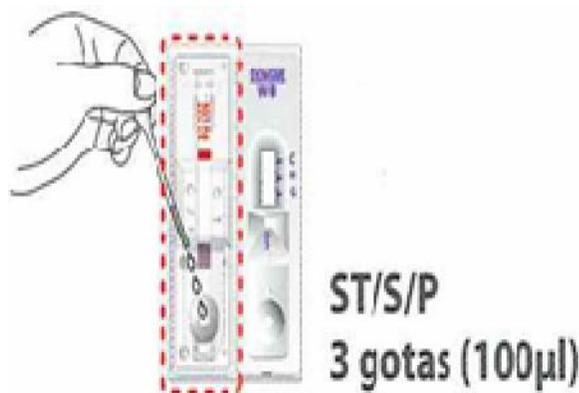
Un R<sub>DO</sub> <0.5 se interpretó como un caso negativo, entre 0.5 R<sub>DO</sub> < 1.0 como indeterminado y R<sub>DO</sub> 1.0 como positivo.

#### II.4. Prueba rápida para la detección de la proteína NS1 en suero: Sistema Comercial SD Dengue Duo (SD Duo).

El sistema comercial SD Duo (Standard Diagnostics, Korea) fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. El SD Duo es una prueba rápida de un solo paso diseñada para detectar la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG a virus dengue de manera cualitativa y diferencial en sangre total, suero y plasma. Este sistema está previsto para el diagnóstico de la infección por dengue durante todas las etapas clínicas, desde la fase febril aguda hasta la fase convaleciente. El cassette contiene dos lados: un lado izquierdo donde se encuentra la prueba para la detección de la proteína NS1 y uno derecho para la detección de los anticuerpos IgM/IgG. En el presente estudio, solo se utilizó la determinación de la proteína viral NS1.

Esta prueba utiliza el principio inmunocromatográfico. La proteína NS1 se une a un conjugado anti-dengue NS1 con oro coloidal, lo que se evidencia por la aparición de una línea coloreada en la región T (NS1) del cassette.

Para la detección de la NS1 se añadieron 3 gotas de la muestra de suero (100 $\mu$ L) en el pozo circular definido, usando una pipeta proporcionada en el estuche, como se muestra la figura II.2.



Fuente: Esquema del protocolo del estuche SD Duo

**Figura II. 2. Representación esquemática de la adición de muestra para la detección de la proteína NS1 en el sistema comercial SD Duo (Standar Diagnostics, Korea).**

Los resultados fueron leídos a los 15-20 minutos por tres técnicos de forma individual y a ciegas.

Interpretación de los resultados.

**NS1 negativa:** cuando apareció una banda coloreada sólo en la región C (control de la prueba) en el cassette. **NS1 positiva:** cuando apareció la banda coloreada en la región T del cassette, más la banda de la región C de control. Una prueba donde no apareció la banda en la región C coloreada, se consideró una prueba no válida.

## **II.5. Análisis estadístico para la evaluación de la proteína viral NS1.**

Para el análisis de los resultados se utilizaron los siguientes programas estadísticos:

- a. **Programa estadístico Epidat 3.1:** Para la determinación de los indicadores de desempeño de los ensayos evaluados en la detección de la proteína viral NS1 (sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo y negativo e índice kappa). También fue utilizado en la comparación de proporciones para la determinación de la significación (p) con intervalo de confianza del 95 % en el análisis de los serotipos virales en relación al tipo de infección primaria y secundaria.

- b. **Programa GraphPad Prim 5.00:** Columna estadística para el análisis de las medias de los días de colecta y los títulos promedios geométricos (TPG) de IgG en relación al tipo de infección primaria y secundaria en muestras tempranas.

## **II.6. Universo de estudio para la evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue.**

Para la evaluación de los anticuerpos IgA como marcador diagnóstico de la infección temprana a virus dengue se trabajaron los sistemas ELISA-IgA y MPD-IgA. Un total de 1065 muestras de suero fueron procesadas por estos ensayos, las cuales habían sido conservadas a -20 °C hasta su utilización. Los sueros agrupados en cada panel se seleccionaron en función de los resultados obtenidos por los ensayos de referencia PCR-TR y serología IgM/IgG.

Para el estudio de los indicadores de desempeño de los sistemas (**objetivo 3**) se confeccionaron 2 paneles:

**Panel 4:** 179 muestras de suero positivas a IgM anti-dengue, procedentes de pacientes con confirmación virológica a Den-3 mediante el PCR-TR y confirmación serológica mediante la detección de IgM/IgG. Todas las muestras fueron colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas. Los casos fueron clasificados según el tipo de infección en 54 con infección primaria y 125 con infección secundaria.

**Panel 5:** 166 muestras de suero negativas a infección por virus dengue, procedentes de 99 pacientes con infecciones no relacionadas a dengue (a estos pacientes no se les pudo definir el agente etiológico causante del cuadro febril) y 67 individuos donantes de sangre supuestamente sanos. Las 99 muestras de suero fueron colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas.

Para el estudio de los anticuerpos IgA como marcador diagnóstico temprano en relación al momento de colecta de la muestra, tipo de infección y reactividad cruzada frente a los serotipos virales (**objetivo 4**), se confeccionó un **panel 6** con muestras colectadas en la fase febril temprana (0-4 días) y la fase convaleciente (5-54 días):

**Panel 6:** 720 muestras de sueros de pacientes confirmados con infección por virus dengue. De ellos 260 fueron colectados en los primeros 4 días de inicio de los síntomas y confirmados como casos positivos mediante los ensayos de referencia (PCR-TR/IgM/IgG). Los casos fueron clasificados según el tipo de infección en 130 con infección primaria y 130 con infección secundaria. Los 460 sueros restantes fueron colectados entre los días 5 y 54 de inicio de los síntomas y confirmados por serología IgM/IgG. La clasificación de los casos según el tipo de infección fue de 170 primarios y 290 secundarios.

Para el estudio de la reactividad cruzada se utilizaron 34 sueros del **panel 4** constituido por 16 primarios y 18 secundarios.

## II.7. Método de ELISA de doble anticuerpo modificado para la detección de IgA específica a virus dengue (ELISA-IgA).

El ensayo ELISA-IgA es un sistema de ELISA de doble anticuerpo modificado para la detección de anticuerpos IgA a virus dengue, que sigue la metodología propuesta por Yap y cols. (2011) (20) y fue adaptado a las condiciones de trabajo del LNR-IPK. Placas de poliestireno (Greiner bio-one) fueron recubiertas con AcM H3/6 anti-complejo dengue producido en el IPK (173), a una concentración de 2,5µg/ml (100µl por pocillo) y se incubaron durante toda la noche a temperatura de 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se bloqueó con albúmina bovina sérica (ABS) al 1% en solución carbonato-bicarbonato (pH 9.6) y se incubó durante una hora a 37 °C. Tras tres lavados con solución tamponada de PBS conteniendo Tween 20 (PBS-T20), se añadieron a los pocillos 100 µL de una mezcla de antígenos conteniendo los cuatro serotipos del virus dengue a 16 unidades hemaglutinantes (UH) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. En el paso siguiente, tras tres lavados con PBS-T20 en iguales condiciones al anterior, se añadieron los sueros diluidos 1/100 en PBS-T20 con leche descremada al 5%. Se incluyeron controles positivos y negativos a igual dilución y se incubó por una hora a 37 °C. El conjugado anti-IgA (anti-Human IgA chain specific peroxidase) producido en carnero (SIGMA, No O77K4790) se preparó en PBS-T20 con leche al 5%, a una dilución 1/20 000 y se añadieron 100 µL a los pocillos tras repetirse nuevamente el paso de tres lavados. Se incubó durante 1 hora a 37 °C. En el paso del sustrato se añadieron 100 µL a los pocillos de una solución compuesta por 25mg de ortofenilendiamina (OPD) con 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 10 mL de solución tampón fosfato citrato (pH 5) y se incubó durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 12.5% y la lectura de las DOs se realizó a una longitud de onda 492 nm en un lector de placas de ELISA (Dynex Technologies).

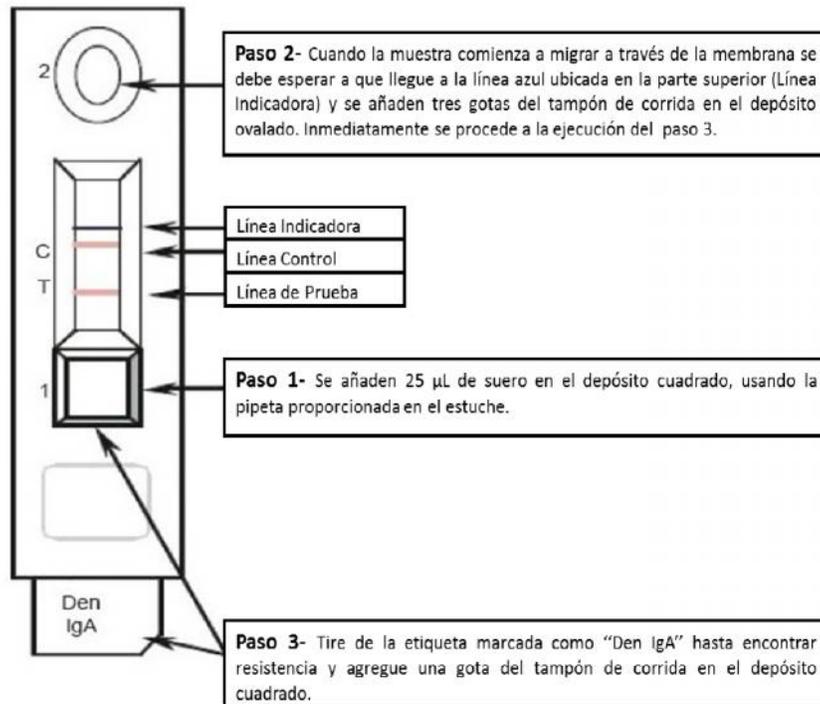
**Criterios de positividad:** Se calculó la relación de densidad óptica (R<sub>DO</sub>) para cada suero según la siguiente fórmula:  $R_{DO} = DO \text{ muestra} / DO \text{ control negativo}$ . Un suero fue considerado positivo si  $R_{DO} \geq 2$ .

## **II.8. Sistema comercial MP Diagnostics ASSURE Dengue IgA rapid test para la detección de anticuerpos IgA específicos a virus dengue (MPD-IgA).**

El sistema comercial MPD-IgA es un ensayo inmunocromatográfico concebido para la rápida detección de anticuerpos IgA contra el virus del dengue en muestras de suero, plasma, o sangre total. Este es un ensayo indirecto donde los anticuerpos específicos a dengue presentes en la muestra forman inmunocomplejos con el antígeno viral inmovilizado en la membrana de nitrocelulosa. Este enlace es detectado a través de un conjugado antihumano IgA-oro coloidal aportando el color rosado-púrpura que se observa en la banda de prueba. La banda de control contiene una proteína L que captura la IgA humana la cual también se une al conjugado.

Los sistemas comerciales inmunocromatográficos para la detección de anticuerpos son analizados mediante la lectura visual de una banda de diferente grado de intensidad. Es de señalar que hasta el momento ninguno de los sistemas comerciales rápidos para dengue no habían mostrado una referencia con valores en función de la intensidad de la línea, como la escala que dispone dentro de sus componentes el sistema MPD-IgA, con valores asignados que van desde 0,2 hasta 3,0 (**Anexo 1**).

El procedimiento de la prueba se realizó en cuatro pasos, los cuales están representados en el siguiente esquema (figura **II.3**):



Fuente: Esquema del protocolo del estuche MPD-IgA

**Figura II. 3. Representación esquemática del procedimiento del sistema MPD-IgA.**

**Interpretación de los resultados:** Un caso se consideró positivo a anticuerpos IgA a dengue si aparecieron bandas coloreadas en la Línea de prueba (T) y en la Línea de control (C). Un caso se consideró negativo de anticuerpos IgA si solo la Línea de control (C) fue visible. La prueba se consideró no válida si la línea de control (C) no apareció.

La lectura de los resultados se realizó por tres lectores a ciegas, los cuales se apoyaron en la escala brindada por el fabricante con diferentes intensidades de banda que permitió una mejor interpretación de los resultados.

Del sistema comercial MPD-IgA, solo fueron suministradas 100 determinaciones por el fabricante, las cuales fueron utilizadas para la evaluación de los indicadores de desempeño procesando 60 muestras positivas (**panel 4**) y 40 negativas (**panel 5**). De las 60 muestras

positivas, 25 fueron clasificadas con infección primaria y 35 con infección secundaria según los ensayos de referencia del LNR-IPK.

### **II.9. Análisis estadístico para la evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue.**

Para el análisis de los resultados se emplearon los programas descritos en el epígrafe **II.5**. También se incluyó el programa **SPSS versión 11.5** para el análisis en el sistema rápido MPD-IgA mediante las curvas “ROC” (del inglés Receiver Operating Characteristic curves), evaluando el área bajo la curva como el indicador a determinar. La interpretación de este se realizó de la siguiente manera: (0.5-0.6): Malo, (0.61-0.75): Regular, (0.76-0.9): Bueno, (0.91-0.97): Muy Bueno y (0.98-1): Excelente.

### **II.10. Aspectos éticos.**

El presente trabajo se ajustó a los principios establecidos en la declaración de Helsinki, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba. Estos resultados se encuentran amparados bajo la certificación del comité de Ética del IPK en los protocolos de investigación titulados: “Estudio de casos de Dengue Hospital Salvador Allende” (CE-IPK 12-08) (Anexo2) y “Fortalecimiento de las capacidades para el diagnóstico y la vigilancia virológica molecular en Cuba” (CE-IPK 35-13) (Anexo3).

*CAPÍTULO III:*  
*RESULTADOS Y DISCUSIÓN.*

## CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### III.1. Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Platelia NS1 en la detección de la proteína viral NS1 frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK.

Como se ha señalado, los ensayos de A. Viral y PCR permiten la confirmación de la infección a partir de muestras colectadas durante la etapa virémica de la enfermedad (121, 174). La primera es una técnica demorada y laboriosa y la segunda aunque rápida, su uso de rutina se hace difícil ya que resulta costosa y no todos los laboratorios tienen posibilidades de realizarla (10). Por otra parte, los métodos serológicos, aunque tienen gran utilidad para el diagnóstico y el seguimiento de epidemias, representan un diagnóstico tardío que requiere de muestras tomadas al menos 5 días después del comienzo de los síntomas (12, 15).

Como una alternativa, se han desarrollado métodos para la detección de antígenos virales, en especial, la proteína viral NS1 (139, 175), marcador temprano de la infección por dengue, tomando como ventaja su propiedad de ser secretada en el medio extracelular durante el proceso de multiplicación viral y facilitando su detección en los primeros días de comienzo del cuadro clínico, correspondiendo a la etapa de viremia (17, 176).

Para la evaluación de los indicadores de desempeño del sistema comercial Platelia NS1 se trabajó un total de 252 muestras de sueros positivas a dengue y 150 negativas pertenecientes a pacientes con infecciones no relacionadas a este agente. Todas las muestras positivas fueron colectadas en la fase febril temprana de la enfermedad (0-4 días) y los ensayos PCR-TR, MAC-ELISA y MEI fueron utilizados como técnicas de referencia del LNR-IPK.

En la Tabla.III.1 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre el ensayo Platelia NS1 y los ensayos de referencia, donde se encontró una coincidencia de 206 sueros positivos y 150 negativos. Un total de 46 sueros fueron no concordantes, resultando positivos por los ensayos de referencia pero negativos por el sistema Platelia.

**Tabla III. 1. Comparación entre el sistema Platelia NS1 y las Técnicas de Referencia en muestras colectadas en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas.**

	<i>Técnicas de Referencia *</i>	
	+	-
<i>Platelia NS1</i> +	<b>206</b>	<b>0</b>
<i>Platelia NS1</i> -	<b>46</b>	<b>150</b>

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

N: 252 positivos y 150 negativos

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 81,75 % (IC 95%: 76,78-86,71), una especificidad de 100 % (IC 95%: 99,64-100) y un índice de validez de 88,56 % (IC 95%: 85,32-91,76). El valor predictivo positivo fue de 100 % (IC 95 %: 99,76-100) y el negativo de 76,53 % (IC 95 %: 70,34-82,72). El índice Kappa fue de 0,76 (IC 95%: 0,71-0,83), mostrando una fuerza de concordancia buena para el sistema Platelia NS1 en comparación con las pruebas de referencia, lo que indica su utilidad para el diagnóstico de la infección por dengue.

Con relación a los 46 sueros discordantes que fueron positivos por los ensayos de referencia y negativos por Platelia, dentro de los resultados previos obtenidos por el LNR-IPK se observó que 35 (76 %) de ellos correspondían a casos con una infección secundaria. Se ha señalado que los niveles elevados de anticuerpos IgG específicos, presentes en muestras de suero, así como el momento de colecta de esta, pueden influir en la detección de esta proteína (175, 177-179). Estas muestras mostraron un TPG (IgG) de 1330 y la media del día de colecta de la muestra fue entre los días 3 y 4 del comienzo de los síntomas.

De manera general, los resultados muestran un buen desempeño del ensayo y una buena capacidad discriminadora en la detección de un caso de infección por dengue.

Se han desarrollado varias evaluaciones del sistema Platelia NS1 mostrando divergencias en los resultados de sensibilidad, mientras que los valores de especificidad siempre se

presentaron elevados. Osorio y col., 2010 (175) en un estudio donde vincularon los resultados correspondientes a varias evaluaciones del sistema Platelia NS1, encuentran una sensibilidad promedio de 70,8 % con una especificidad siempre superior al 90 %. De igual manera, Shan y col., 2015 (179) obtienen un valor medio de sensibilidad de 66 % y valores de especificidad por encima de un 95 %. A diferencia de estos dos estudios, Dussart y col., 2006 y 2008 (176, 180) y Queroz Lima y col., 2010 (181) informan porcentajes de sensibilidad por encima del 80 % y una especificidad del 100 % para cada evaluación. Los resultados obtenidos del presente trabajo están acordes a estos últimos estudios presentados.

Cuando se realizó el análisis de la positividad del sistema Platelia NS1 respecto a los ensayos de referencia utilizados en la confirmación de los 252 sueros positivos a dengue, se encontró que en los 206 sueros en los que se detectó la proteína NS1, el 93,68 % (193/206) de las muestras habían sido confirmadas por PCR-TR y un 6,31 % (13/206) habían sido confirmadas solamente por los ensayos serológicos (IgM/IgG). Estos resultados muestran al sistema Platelia con un elevado nivel de confirmación en muestras tempranas, fundamentalmente en aquellas que fueron confirmadas por el PCR-TR. También fue capaz de detectar casos (13) que no fueron confirmados por este sistema de referencia, lo que sugiere que de no contar con el ensayo Platelia, esos casos tuvieran que esperar hasta una segunda toma de muestra al 6to día de comienzo de los síntomas para ser confirmadas por los métodos serológicos, lo que representa un diagnóstico confirmatorio tardío. Sin embargo, pueden ser detectados y confirmados en la etapa febril temprana mediante el ensayo Platelia NS1.

Por otra parte, cuando se analizaron de forma independiente los porcentajes de positividad por el sistema en estudio y el ensayo de referencia PCR-TR, en el total de las muestras, se observó una similitud entre ellos con un 81,75 % (206/252) para Platelia NS1 y un 86,50 % (218/252) para el PCR-TR, lo que indica un comportamiento del sistema Platelia al nivel de un ensayo de referencia, lo cual apoyaría su utilización como sistema diagnóstico confirmatorio en la fase febril temprana de la enfermedad y pudiera ser empleado como parte de la vigilancia de laboratorio en el país. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por Dussart y col. 2008 (180) y Phoung y col. 2009 (182), que reportaron porcentajes similares de positividad mediante los sistemas de Platelia NS1 y RT-PCR (NS1: 82,3 % /RT-PCR: 81,6 %

y NS1:37 %/ RT-PCR: 37 % respectivamente). Otros estudios como los realizados por McBride y col. 2009 (183) y Kumarasamy y col. 2010 (184) muestran porcentajes mayores del sistema Platelia frente al RT-PCR, con valores comparativos de 81,3 % (47/58) y 79,3 % (46/58) y de 93,4 % (199/213) y 66,7 % (142/213) respectivamente.

### III.2. Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial SD Duo en la detección de la proteína viral NS1 frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK

Los ensayos de PCR y los inmunoenzimáticos (ELISA) requieren de condiciones de laboratorio, así como de personal entrenado para su desarrollo. Los ensayos inmunocromatográficos como sistemas diagnóstico se muestran como una alternativa rápida, de fácil procedimiento y que no requieren de un conocimiento técnico específico, ni de equipamiento para su procesamiento (185).

Para la evaluación de los indicadores de desempeño del sistema comercial SD Duo también fueron procesados los paneles de muestras utilizados en la evaluación del sistema Platelia NS1 y de igual manera, los ensayos de referencia del LNR-IPK. En la tabla III.2. se muestra la comparación entre el sistema rápido SD Duo y los ensayos de referencia, trabajando con muestras que fueron colectadas entre los días 0 y 4 del comienzo de los síntomas.

**Tabla III. 2. Comparación entre SD Duo y las Técnicas de Referencia en muestras de sueros colectados en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas.**

		<i>Técnicas de Referencia*</i>	
		+	-
<i>SD Duo</i>	+	<b>172</b>	<b>0</b>
	-	<b>80</b>	<b>150</b>

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

N: 252 positivos y 150 negativos

Como resultado se obtuvo una sensibilidad de 68,25 % (IC 95%: 62,31-74,20), una especificidad de 100 % (IC 95%: 99,67-100), un índice de validez de 80,10 % (IC 95%: 76,07-84,13), un valor predictivo positivo de 100 % (IC 95 %: 99,71-100) y un valor predictivo negativo de 65,22 % (IC 95 %: 58,84-71,59). Estos resultados muestran un buen desempeño del ensayo y una buena capacidad discriminatoria del sistema en la detección de un caso de dengue. Sin embargo, al comparar los resultados con el sistema Platelia NS1, la sensibilidad del SD Duo fue menor. Otros estudios que han evaluado la sensibilidad de los sistemas de tiras rápidas con respecto a los sistemas diagnósticos de ELISA, han evidenciado la superioridad de estos últimos en cuanto a los parámetros de sensibilidad (186), lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio.

El índice Kappa para el sistema SD Duo fue de 0,62 (IC 95%: 0,55-0,69), mostrando una fuerza de concordancia buena en comparación con los sistemas de referencia, lo que sugiere su posible utilidad para el diagnóstico de infección por dengue.

Con relación a los 80 casos discordantes que fueron positivos por los ensayos de referencia y negativos por SD Duo, se pudo observar que 45 (56 %) muestras correspondieron a casos con una infección primaria y 35 (44 %) con una infección secundaria. A diferencia del sistema Platelia no se evidencia una influencia por el número de casos secundarios presentes, ni por el momento de colecta de la muestra, pues los resultados previos obtenidos por el LNR-IPK mostraron para los 35 casos con infección secundaria un TPG bajo (92) y una media de días de colecta en los dos primeros días de inicio de los síntomas. Esta situación pudiera estar relacionada a la dificultad del sistema de detectar bajas concentraciones de NS1.

Los resultados reportados por otros autores en cuanto a los valores de sensibilidad y especificidad en las diferentes evaluaciones realizadas de este sistema han sido variables, aunque siempre han mostrado valores de especificidad superiores a un 95 %. Tricou y col. (187) y Wang y Serakan (188) en 2010 observan porcentajes de 62,4 % y 52,5 % respectivamente. Estudios más recientes realizados en el año 2014 por Gan y col. (189) y Sánchez Vargas y col. (190) reportan valores de sensibilidad superiores al 80 %, y de especificidad del 100 % en ambos estudios.

Al realizar un análisis similar al efectuado con el sistema Platelia para determinar la positividad del sistema SD Duo respecto a las pruebas de referencia, encontramos que el ensayo es capaz de detectar el 91,9 % (158/172) de las muestras confirmadas por PCR-TR, además de un 8,1 % (14/172) de las muestras positivas solamente por los ensayos serológicos (IgM/IgG). Estos resultados muestran al sistema SD Duo con un elevado nivel de positividad en muestras tempranas, fundamentalmente en aquellas que fueron confirmadas por el PCR-TR.

Entre las posibles causas existentes para que el sistema molecular PCR-TR genere falsos negativos en muestras positivas a virus dengue, están la inadecuada recolección, almacenamiento y transporte de la muestra, su colecta tardía (posterior al 5to día de inicio de los síntomas) y sueros con un número de copias virales inferior al límite de detección del ensayo. Por tanto, es posible que los sistemas de detección de la proteína viral NS1 puedan detectar casos positivos que no pueden ser detectados por la PCR-TR. Esto puede ser explicado, en primer lugar, porque los marcadores a detectar por ambos sistemas son diferentes (genoma viral y NS1), y en segundo lugar, aunque se reporta una estrecha asociación entre la multiplicación viral y la secreción de NS1 (51, 135, 191), ambos procesos ocurren por vías independientes. La NS1 puede encontrarse en dos formas oligoméricas en el interior de la célula, la forma asociada a membrana (mNS1) y la secretora (sNS1) (13). Se ha descrito que la mNS1 participa como un cofactor esencial en la replicación viral, estabilizando la estructura del complejo de replicación e interactuando con las proteínas NS4A y NS4B, mientras que la sNS1 transita por otra vía a través del retículo endoplasmático y complejo de Golgi hasta ser secretada al medio extracelular (13). Es la forma oligomérica secretora la que puede ser detectada por estos sistemas diagnósticos, además no constituye un componente para el proceso de ensamblaje del virión.

Al realizar el análisis de forma individual de los porcentajes de positividad entre el SD Duo y el ensayo PCR-TR para el total de muestras trabajadas, se encontraron valores mucho más bajos del sistema SD Duo con relación al PCR-TR (SD Duo: 68,25 % (172/252) y PCR: 86,50 % (218/252). Es de señalar que aunque un porcentaje del 68 % pudiera ser considerado

de utilidad para brindar un diagnóstico en la etapa temprana de la infección, este resultado muestra valores más bajos a los obtenidos por el sistema Platelia.

Analizando los porcentajes de positividad de los sistemas en estudio y observando los elevados niveles de detección del Platelia a nivel de un sistema de referencia, se procedió a la comparación de ambos ensayos (tabla III.3).

**Tabla III. 3. Comparación entre SD Duo y el Sistema Platelia NS1 en muestras de sueros colectados en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas.**

		<i>Platelia NS1</i>	
		+	-
<i>SD Duo</i>	+	<b>161</b>	<b>0</b>
	-	<b>45</b>	<b>150</b>

N: 206 positivos y 150 negativos

Como resultado de la comparación del SD Duo con el Platelia como técnica de referencia se obtuvo una sensibilidad de 78,16 % (IC 95%: 72,27-84,04), una especificidad de 100 % (IC 95%: 99,67-100), un índice de validez de 87,36 % (IC 95%: 83,77-90,95), un valor predictivo positivo de 100 % (IC 95 %: 99,69-100) y un negativo de 76,92 % (IC 95 %: 70,75-83,09). El índice Kappa fue de 0,69 (IC 95%: 0,62-0,77), mostrando una fuerza de concordancia buena para el sistema SD Duo.

La sensibilidad del SD Duo fue mayor (78,16 %) a la obtenida cuando se comparó con el PCR-TR (68,25 %), lo que hablaría en favor de la validez al comparar sistemas que detecten un mismo marcador. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores en estudios similares, tales como el de Vicker y col. 2015 (192) el cual detectó una sensibilidad elevada del 90 % para el sistema SD Duo utilizando como sistema de referencia el Platelia NS1

Por otra parte, de las 45 muestras discordantes que fueron positivas por Platelia NS1 y no por SD Duo, 35 (76 %) de ellas pertenecían a casos con infección primaria y 10 (24 %) a casos con infección secundaria. Cuando se analizaron los niveles de anticuerpos IgG presentes en las muestras se encontró que eran negativos en primarios y bajos en secundarios con TPG de 35, además la media de colecta de la muestra para este último grupo estuvo alrededor del día 2 de inicio de los síntomas. Los resultados obtenidos en estas muestras discordantes pudieran sugerir que el sistema Platelia NS1 detecta concentraciones más bajas de la proteína NS1 libre en las muestras de suero que el sistema SD Duo.

### III.3. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial Platelia NS1.

En la figura III.1. se muestran los porcentajes de positividad a NS1 en relación con el día de colecta de las muestras y del tipo de infección primaria o secundaria.

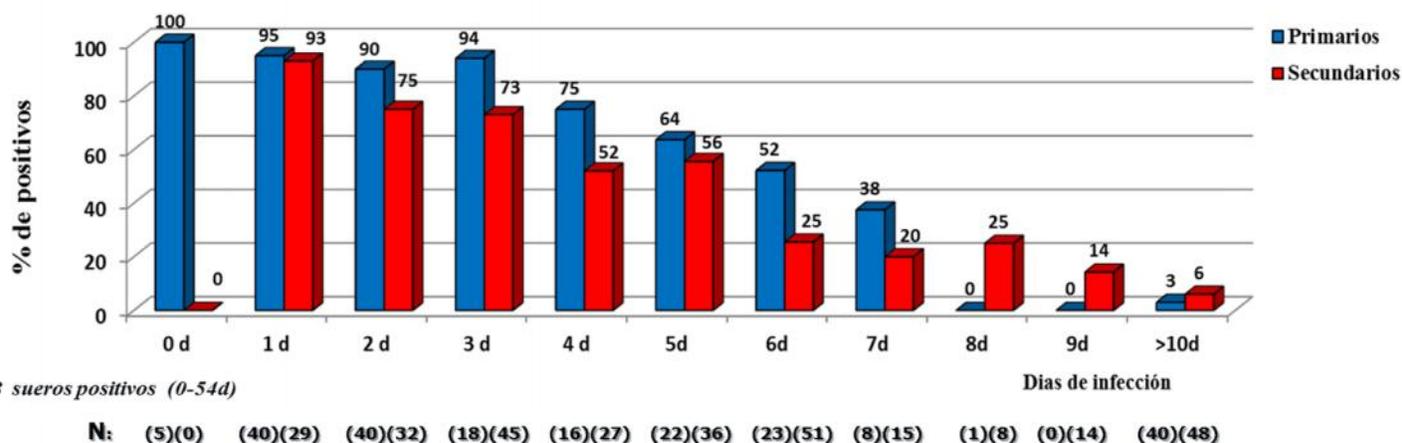


Figura III. 1. Porcentajes de positividad a NS1 en relación al tipo de infección primaria o secundaria y día de colecta de la muestra (0-54 días) mediante el sistema Platelia NS1.

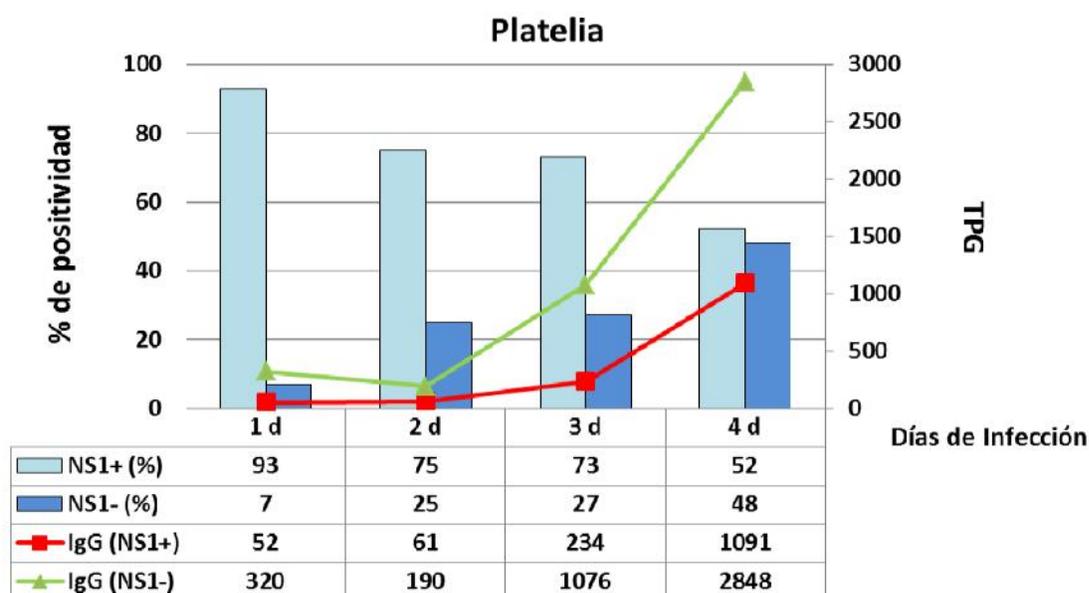
Los porcentajes mostrados en la figura III.1 como 0 % en los días 0 para secundarios y 8 y 9 en primarios, representan la ausencia de muestras evaluadas. En el análisis de las muestras colectadas en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas, se encontraron los mayores porcentajes de positividad de NS1, observando la menor detección hacia el día 4 de colecta de la muestra. En el 90,7% de los casos con infección primaria por dengue se detectó la proteína NS1, mientras que en los casos de infección secundaria se detectó en un 73,7%, lo que al parecer sugiere que el sistema Platelia permite una mayor detección de casos con infección primaria ( $p=0,0008$ ). Estos resultados coinciden con los reportes de Osorio y col. 2010 (175) y Shan y col. 2015 (179), que plantean menores porcentajes de casos positivos detectados con infección secundaria, relacionando este comportamiento a la presencia de anticuerpos anti-NS1 en el suero. En la etapa temprana de una infección secundaria, pueden ser detectados niveles de anticuerpos, principalmente de tipo IgG, correspondientes a una infección previa, como parte de una respuesta inmunológica de linfocitos B de memoria. Estos anticuerpos al unirse a la proteína NS1 libre darían lugar a la formación de inmunocomplejos, los cuales pudieran interferir con el reconocimiento de esta proteína viral por parte del anticuerpo monoclonal presente como diseño del sistema comercial (179, 193, 194) y dar como resultado valores más bajos de detección en estos casos.

En las muestras colectadas con más de cuatro días de inicio de los síntomas (figura III.1), se observó que los porcentajes presentados al 5to día de colecta fueron superiores a un 50 %, tanto para casos primarios como secundarios, considerándose estos valores aún satisfactorios para el diagnóstico y permitiendo incrementar la probabilidad de detección y confirmación de un caso de dengue. Por otra parte, se observó una continua disminución de los porcentajes de NS1 tanto en casos primarios como secundarios, lo que pudiera estar relacionado con la producción y maduración de nuevos anticuerpos contra dicha proteína, desarrollados ante la infección con el nuevo serotipo viral infectante.

La presencia de NS1 en sueros con más de 10 días de colecta, específicamente el día 12 en primarios y el día 13 en secundarios, pudiera deberse a que esta proteína permanece circulando en sangre por más tiempo, aún cuando ya ha pasado la etapa virémica. Este momento es representativo de una etapa de convalecencia en el paciente de dengue. Los resultados

obtenidos son semejantes a los reportados por Shu y col. 2003 (195), Dussart y col. 2006 (176) y Hu y col. 2011 (196) donde señalan una duración de la NS1 en sangre entre los días 8 y 14 del inicio de los síntomas.

Para explicar la influencia de los anticuerpos IgG presentes en los casos con una infección secundaria, se realizó un análisis comparativo de los porcentajes de detección de NS1 y de los niveles de anticuerpos IgG presentes en las muestras colectadas durante los primeros cuatro días de inicio de los síntomas (figura III.2).



**Figura III. 2. Comparación de los porcentajes de positividad de NS1 y los niveles de anticuerpos IgG presentes en sueros de casos secundarios, colectados en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas y procesados por Platelia NS1. Eje Y principal: porcentajes de positividad de NS1. Eje Y secundario TPG de IgG.**

Se puede observar que los mayores niveles de anticuerpos IgG se encontraron en las muestras con una NS1 negativa por el sistema Platelia. De igual manera se vió una disminución de los

porcentajes de positividad a la proteína NS1 con el incremento de los niveles de anticuerpos en el tiempo, así como la mayor interferencia de estos sobre la detección de la NS1 hacia el tercer y cuarto día de colecta de la muestra, donde se encontraron los mayores TPG de IgG, indicando como un momento óptimo de detección los dos primeros días de comienzo de los síntomas, para casos secundarios.

Incrementos en los niveles de detección de la proteína viral NS1 para los casos secundarios pueden ser logrados mediante el tratamiento de los sueros con métodos para la disociación de los posibles inmunocomplejos formados. Varios protocolos han sido descritos para infecciones virales (197-199) pero en dengue existen muy pocos reportes, referentes a investigaciones y no como parte del diagnóstico. Koraka y col. 2003 (177), Lapphra y col. 2008 (178) y Shen y col. 2015 (200) reportan un incremento de la sensibilidad de los sistemas de detección de la proteína NS1 utilizados en sus investigaciones desde 23 % hasta 78 %, 63% hasta 72% y 40% hasta 85 % respectivamente, mediante el tratamiento de los sueros con una solución de glicina al 1.5 M para disociar los posibles inmunocomplejos formados. Estos resultados no solo sugieren la utilidad de esta metodología para ser incorporada en el diagnóstico sino también corroboran el papel de la presencia de los anticuerpos sobre la detección de la proteína NS1.

#### **III.4 Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación a la sensibilidad al serotipo viral infectante y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial Platelia NS1.**

Utilizando las 218 muestras (**panel 1**) que fueron confirmadas por el PCR-TR, se analizó la sensibilidad del sistema Platelia en relación al serotipo infectante, tanto en casos primarios como en secundarios (Tabla III.4).

**Tabla III. 4. Porcentaje de positividad de la proteína NS1 en relación a los serotipos virales y tipo de infección, utilizando el sistema comercial Platelia NS1.**

	<i>PRIMARIOS</i>		<i>SECUNDARIOS</i>		<i>TOTAL</i>	
<i>SEROTIPOS</i>	<i>MUESTRAS*</i>	<i>%</i>	<i>MUESTRAS*</i>	<i>%</i>	<i>MUESTRAS*</i>	<i>%</i>
<i>DEN-1</i>	-	-	1/1	100	1/1	100
<i>DEN-2</i>	10/12	83,3	15/25	60,0	25/37	67,6
<i>DEN-3</i>	71/72	98,6	48/51	94,1	119/123	96,7
<i>DEN-4</i>	18/22	81,8	30/35	85,7	48/57	84,2

\* Proporción = (casos NS1 positivos/ total de casos)

N: 218 positivos por PCR-TR

En el estudio solo fue detectada una muestra positiva a Den-1 por lo que no se incluyó en el análisis este serotipo. Al observar la posible relación entre el resto de los serotipos virales (Den-2, 3 y 4) y la presencia de NS1 en el grupo de infección primaria, se encontraron diferencias significativas entre Den-3 y 4 ( $p=0.0114$ ). En los casos de infección secundaria la significación fue dada entre los serotipos Den-2 y Den-3 ( $p=0.0007$ ). Al comparar los grupos de infección primaria y secundaria para cada serotipo correspondiente entre sí, no se encontraron diferencias significativas.

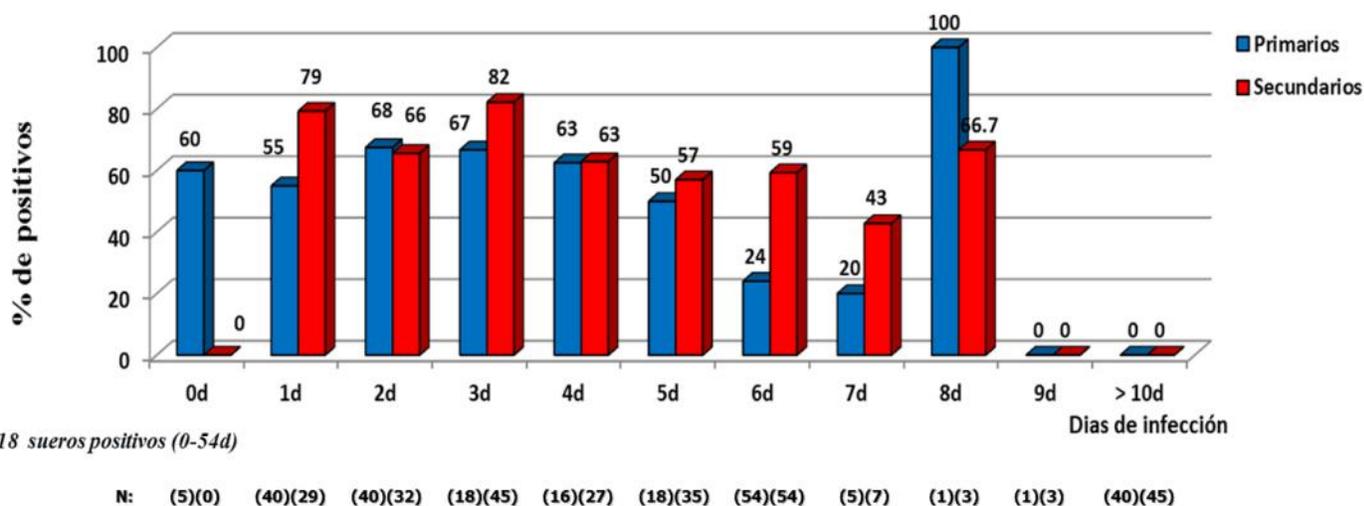
Reportes realizados por Shan y col (2015) (200) donde se analizaron varias evaluaciones de este ensayo plantean que los mayores porcentajes de positividad se presentan hacia los serotipos Den-1 y Den-3, no siendo así para los serotipos Den-2 y Den-4. Los porcentajes de positividad de NS1 obtenidos para cada serotipo evaluado en el presente estudio fueron superiores al 50 %, lo que evidencia una buena relación entre la presencia de NS1 y el serotipo infectante tanto para casos con infección primaria como secundaria. Para Den-4 en primarios, aunque es el porcentaje más bajo obtenido, es elevado y considerable para un diagnóstico. Sin embargo, para Den-2 en secundarios, se presenta la detección más baja por el sistema Platelia. En un análisis comparativo teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos por el LNR-IPK, encontramos una media aritmética del día de colecta hacia el 3er día de inicio de los síntomas y TPG de 160 para Den-2, no siendo así para el Den-3 donde el día promedio de

colecta fue el 2 con un TPG de 98, indicativo de una menor detección de la proteína NS1 para los casos infectados con Den-2. Reportes realizados por Guzmán y col. 2010 (201) señalan que la diferencia de sensibilidad en la detección de la NS1 entre los serotipos de dengue pudiera estar relacionada con los niveles de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales utilizados en los sistemas por los epítopes relevantes de la proteína NS1.

El sistema Platelia NS1 ha mostrado ser un ensayo diagnóstico de amplio valor para ser utilizado como sistema confirmatorio en etapas tempranas de la infección por virus dengue, con porcentaje elevado de detección y a niveles similares a lo mostrado por el sistema de referencia PCR-TR. Como sistema, el Platelia cumple con los requisitos fundamentales tanto para el diagnóstico como para la vigilancia virológica, ya que muestra ser un sistema sensible, rápido en su procesamiento, confirma infección viral y permite dar un seguimiento de la situación epidemiológica, aunque a diferencia del PCR-TR no es capaz de serotipar el agente infectante. Se ha señalado que en este ensayo pueden emplearse otras muestras como: sangre total, saliva, orina y piezas de necropsia (168, 169, 202). Reportes de Korhonen y col. 2014 (202) evidencian la detección de la proteína NS1 en muestras no invasivas como saliva y orina, además estudios realizados por Lima Mda y col. 2011 (169) detectan NS1 en muestras de tejidos de casos fatales utilizando también el sistema en estudio.

### **III.5. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial SD Duo**

De manera similar a lo realizado con el sistema Platelia, se determinaron para el SD Duo los porcentajes de positividad de NS1 en relación al día de colecta de las muestras y del tipo de infección primaria o secundaria según la clasificación mediante los sistemas de referencia (figura III.3).



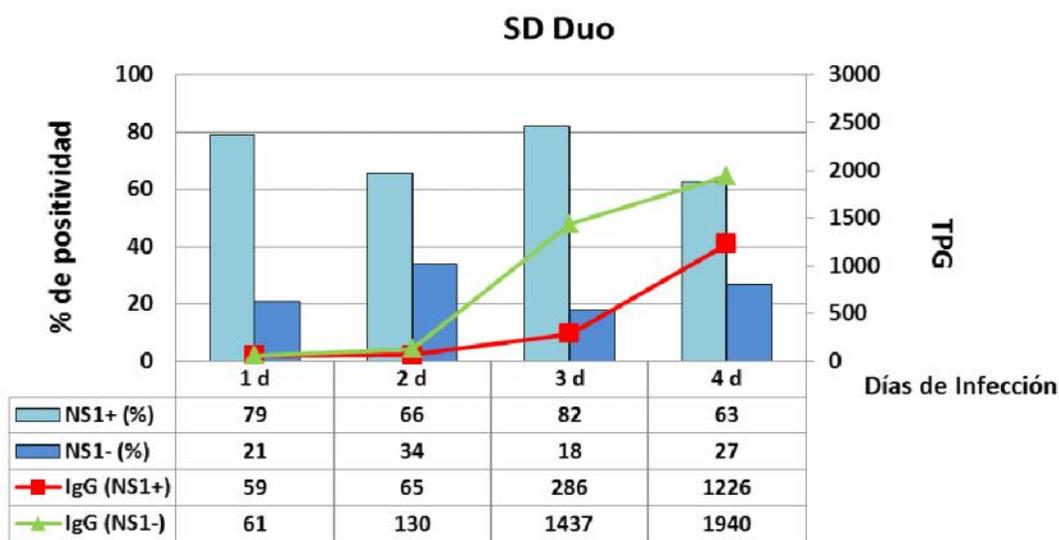
**Figura III. 3. Porcentajes de positividad a NS1 en relación al tipo de infección primaria o secundaria y día de colecta de la muestra (0-54 días) mediante el sistema comercial SD Duo.**

Al evaluar los porcentajes de detección de NS1 en las muestras colectadas en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas, y el tipo de infección primaria o secundaria por el sistema SD Duo, se observaron los mejores porcentajes de positividad para esta etapa. Además, se encontraron valores de detección de la proteína NS1 mayores en casos secundarios (73,7 %) que en casos primarios (62,2 %), pero sin significación estadística ( $p=0,0684$ ), a diferencia de los resultados obtenidos por el sistema Platelia NS1. Varios estudios realizados sobre este sistema SD Duo, muestran un comportamiento diferente, donde se favorece la detección de NS1 en casos primarios con respecto a los secundarios, sin embargo ellos no encuentran diferencias significativas en los porcentajes de positividad entre ambos grupos (189, 190, 192). Resultado similar fue obtenido en la presente investigación.

En el análisis de las muestras colectadas con 5 días o más de inicio de los síntomas, también se observó un comportamiento al 5to día, equivalente a lo encontrado por el sistema Platelia NS1, con valores superiores al 50 % lo que ampliaría la posibilidad diagnóstica de detección y confirmación de un caso de dengue. La duración de la NS1 detectada por el sistema SD Duo tanto para casos primarios como secundarios fue hasta el 8vo día de inicio de los síntomas,

similares resultados a los reportados por Wang y Serakan (2010) (188). Es de señalar que aunque se observó un 100 % de detección al día 8 en primarios esto corresponde al resultado de un solo suero, por lo que no debe tenerse en cuenta.

Como resultado interesante se encontró el mismo porcentaje de casos positivos con infección secundaria detectados por los sistemas SD Duo y Platelia NS1 (73,7 %). Al realizar el análisis de los porcentajes de detección de la proteína NS1 en función de la presencia o no de anticuerpos IgG en muestras secundarias, se observa igual comportamiento al encontrado con el sistema Platelia NS1 (figura.III.4).



**Figura III. 4. Comparación de los porcentajes de positividad de NS1 y los niveles de anticuerpos IgG presentes en sueros de casos secundarios, colectados en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas y procesados por el SD Duo. Eje Y principal: porcentajes de positividad de NS1. Eje Y secundario TPG de IgG.**

Los títulos de anticuerpos IgG son mayores en las muestras que resultaron negativas a NS1, demostrando que la diferencia entre ambos ensayos radica en el porcentaje de detección de NS1 en los casos primarios donde para Platelia fue del 90,7% y para el SD Duo fue del 62.2%. Este resultado pudiera estar influenciado por los bajos niveles de NS1 presentes en las muestras de los casos primarios como se señaló anteriormente, sugiriendo el sistema SD Duo

no es capaz de detectar bajas concentraciones de la proteína a diferencia del sistema Platelia NS1.

**III.6. Evaluación de la proteína viral NS1 como marcador diagnóstico en la fase febril temprana de la infección por virus dengue, en relación a la sensibilidad al serotipo viral infectante y el tipo de infección primaria y secundaria mediante el sistema comercial SD Duo.**

Al igual que en el estudio con el sistema Platelia no se incluyó en el análisis el serotipo1. Cuando se comparó la respuesta a los serotipos virales en relación al tipo de infección (Tabla III.5) se obtuvo solamente diferencia significativa en la comparación entre primarios y secundarios para el serotipo Den-3 ( $p=0,0220$ ). En dos metanálisis desarrollados por Osorio y col (2010) (175) y Zhang y col (2014) (139) sobre varias evaluaciones del sistema SD Duo, las mayores respuestas en porcentajes de positividad fueron para los serotipos Den-1 y Den-3. El porcentaje de positividad presentado para Den-3 en la presente investigación, aunque significativo no influye en el resultado final de la prueba donde los porcentajes para los tres serotipos son similares.

**Tabla III. 5. Porcentaje de positividad de la proteína NS1 en relación a los serotipos virales y tipo de infección, utilizando el sistema comercial SD Duo.**

SEROTIPO	PRIMARIOS		SECUNDARIOS		TOTAL	
	MUESTRAS*	%	MUESTRAS*	%	MUESTRAS*	%
DEN-1	0/0	-	1/1	100	1/1	100
DEN-2	9/12	75,0	18/25	72,0	27/37	73,0
DEN-3	46/72	63,9	43/51	84,3	89/123	72,3
DEN-4	14/22	63,6	28/35	80,0	42/57	73,7

\*Proporción = (casos NS1 positivos/ total de casos)

N: 218 positivos por PCR-TR

El sistema SD Duo presenta ventajas y desventajas con respecto al sistema Platelia NS1. Entre sus ventajas se encuentran la rapidez en el procesamiento (20 minutos), la no complejidad de su procedimiento, y la posibilidad de no disponer de equipamiento especializado y condiciones de laboratorio, lo cual permite su desarrollo a niveles secundarios y primarios de salud. Entre las limitaciones pudieran encontrarse el corto tiempo de contacto de los componentes, la temperatura de incubación y el volumen empleado de muestra. El sistema SD Duo mostró porcentajes de positividad en un rango entre 68 y 78 % al comparar los resultados obtenidos con las pruebas de referencia y el sistema Platelia NS1 respectivamente. Estos porcentajes pueden considerarse buenos para un sistema de tira rápida, lo que permite su utilización como prueba de pesquisa inicial en caso de sospecha clínica de una infección por virus dengue y también podría apoyar la toma de decisión por parte del médico de asistencia para un mejor manejo clínico del caso ingresado.

No obstante, se considera que el sistema Platelia NS1 ha mostrado los mejores resultados en cuanto a sensibilidad con respecto al SD Duo y es por ello que la propuesta de detección de la proteína NS1 mediante el sistema Platelia debe ser valorada como primera opción para el algoritmo diagnóstico.

### **III.7. Evaluación de los indicadores de desempeño del sistema no comercial ELISA-IgA para la detección de los anticuerpos IgA a virus dengue frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK.**

Los métodos serológicos han sido de gran utilidad para el diagnóstico del dengue y el seguimiento de una epidemia, principalmente mediante la detección de anticuerpos IgM por métodos inmunoenzimáticos; que aunque el diagnóstico no es temprano, es en la actualidad la principal herramienta en todos los laboratorios que realizan esta actividad (11, 15).

A pesar de la gran utilidad de las técnicas serológicas, se ha seguido trabajando en la búsqueda de métodos que permitan brindar un diagnóstico rápido y temprano, lo cual conllevaría a la valoración en el menor tiempo posible del caso y su tratamiento. La detección de los anticuerpos IgA en etapas tempranas de la infección se ha planteado que pudiera ser unas de

estas alternativas para la confirmación del caso y definición del tipo de infección primaria o secundaria (23, 170).

La Tabla III.6 muestra la comparación entre el sistema ELISA-IgA y el ensayo de referencia MAC-ELISA, trabajando principalmente con muestras colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas. La coincidencia entre ambos ensayos fue de 163 sueros positivos y 139 negativos. En 43 sueros los resultados fueron discordantes, de ellos 16 fueron positivos por el ensayo de referencia y negativos por el sistema en estudio y 27 mostraron un reconocimiento inespecífico por el sistema ELISA-IgA.

**Tabla III. 6. Comparación entre ELISA-IgA y MAC-ELISA en muestras de suero colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas.**

		MAC-ELISA	
		+	-
ELISA-IgA	+	163	27
	-	16	139

N: 179 positivos y 166 negativos

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 91,06 % (IC 95%: 86,60-95,52), una especificidad de 83,73 % (IC 95%: 77,82-89,65), un índice de validez de 87,54 % (IC 95%: 83,91-91,17), un valor predictivo positivo de 85,79 % (IC 95 %: 80,56-91,02) y uno negativo de 89,68 % (IC 95 %: 84,57-94,79). El sistema muestra un buen desempeño y discriminación de casos. El índice de Kappa fue de 0,75 (IC 95%: 0,68-0,82), para una fuerza de concordancia buena del sistema ELISA-IgA, lo que apoya su posible utilidad como sistema para la detección de IgA anti-dengue.

Los resultados mostraron una adecuada sensibilidad del sistema para la detección de IgA en muestras con confirmación serológica, a pesar de que la especificidad se vió afectada por 27

casos que resultaron falsos positivos por el ensayo. Estas muestras fueron colectadas de pacientes febriles procedentes de la vigilancia, confirmados como casos no dengue, pero para los cuales no se contaba con un diagnóstico del agente etiológico causante del estado febril.

Pocos estudios han evaluado los anticuerpos IgA como posible marcador diagnóstico de infección por dengue. Entre ellos, el trabajo realizado por Balmaseda y col, (23, 203) en los años 2003 y 2008, encontraron porcentajes de sensibilidad y especificidad de 94,4 % y 74,7 % y 93,0 % y 83,0 % respectivamente, mediante un sistema ELISA de captura de anticuerpos IgA. Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con los reportados por estos autores. Recientemente, se publicó el primer estudio utilizando un sistema ELISA comercial de captura para la determinación de anticuerpos IgA anti-dengue de la firma francesa Biorad (Platelia) (204), el cual muestra valores de sensibilidad y especificidad de 93 % y 88 % respectivamente. Los investigadores refieren que la inespecificidad observada en su sistema pudiera estar relacionada a la presencia de IgA correspondiente a una infección previa por dengue o posiblemente una IgA altamente reactiva producida ante otro *flavivirus*. Con relación a la inespecificidad encontrada en el presente estudio, pudiera deberse a una respuesta de IgA producida por el agente no dengue causante del cuadro febril, capaz de reconocer de forma inespecífica al antígeno de dengue, ya que en el periodo de colecta de las muestras (2010-2014) no había circulación de otros *flavivirus* en el país

### **III.8. Evaluación de los indicadores de desempeño del sistema comercial MPD-IgA para la detección de los anticuerpos IgA a virus dengue frente a los ensayos de referencia del LNR-IPK**

Se han evaluado varios sistemas comerciales rápidos principalmente para la detección de anticuerpos IgM e IgG en el diagnóstico del dengue. Sin embargo, el sistema MPD-IgA para la detección de anticuerpos IgA anti-dengue aparece en los últimos años, como una alternativa para el estudio de este anticuerpo (25).

Para el análisis del desempeño del sistema MPD-IgA se utilizó el ensayo ELISA-IgA como ensayo de referencia teniendo en cuenta que ambos métodos detectan el mismo marcador.

Como se refirió en materiales y métodos del sistema comercial MPD-IgA, solo fueron suministradas 100 determinaciones por el fabricante, las cuales fueron utilizadas para la evaluación de los indicadores de desempeño, procesando 60 muestras positivas (**del panel 4**) y 40 negativas (**del panel 5**). De las 60 muestras positivas trabajadas, dos resultaron invalidadas ya que no se observó la banda control C. Por tanto, para la evaluación se incluyeron 58 muestras, de las cuales 24 fueron casos primarios y 34 secundario. Los resultados de la comparación se muestran la tabla III.7.

**Tabla III. 7. Comparación entre MPD-IgA y ELISA-IgA en muestras de suero colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas.**

	ELISA-IgA	
	+	-
MPD-IgA +	50	3
MPD-IgA -	8	37

N: 58 positivos y 40 negativos

Como se observa ambas pruebas tuvieron una coincidencia en 50 muestras positivas y 37 negativas y mostraron 11 sueros discordantes. El análisis comparativo también mostró una sensibilidad y especificidad del MPD-IgA con valores de 86,21% (IC 95%: 76,47-95,94) y 92,50% (IC 95%: 83,09-100) respectivamente, índice de validez de 88,78% (IC 95%: 82,02-95,54), valor predictivo positivo de 94,34 % (IC 95 %: 87,17-100) y negativo de 82,22 % (IC 95 %: 69,94-94,50), lo que indica un buen desempeño y elevada discriminación de este sistema a pesar de ser un método inmunocromatográfico. El índice de Kappa fue de 0,77 con un IC de 0,95 y muestra una fuerza de concordancia buena con respecto al sistema de referencia, lo que avala su posible utilización como método para la detección de IgA.

La mayor sensibilidad por los sistemas ELISAs sobre los sistemas de tiras rápidas ha sido demostrada con anterioridad (186) y esto pudiera explicar la presencia de 8 muestras con resultados falsos negativos por la prueba. También, la presencia de 3 (7,5%) falsos positivos pudiera deberse a un reconocimiento inespecífico de la IgA en pacientes con un cuadro febril no dengue cuyo agente causal no fue diagnosticado. Estos resultados se corroboran con los mostrados en el estudio de validación de la prueba realizado por el fabricante, donde se encontró un 15,4 % de falsos positivos en muestras correspondientes a pacientes febriles y con otras patologías no dengue como: hepatitis A, B y E; Epstein Barr y Malaria.

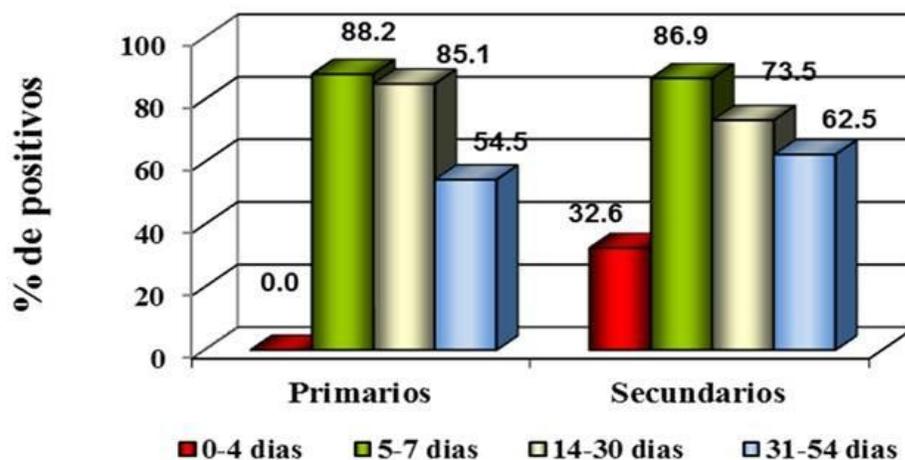
Dentro de las cuatro evaluaciones del sistema MPD-IgA que han sido reportadas, la sensibilidad muestra valores entre 80,9 % y 99,2 % y la especificidad entre 61,0 % y 99,2 % (205-208). Los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos de sensibilidad y especificidad reportados por estos autores (205-208).

### **III.9. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue como marcadores diagnósticos en la fase febril temprana de la enfermedad en relación al momento de colecta de la muestra y al tipo de infección mediante el sistema ELISA-IgA .**

A pesar de que los anticuerpos IgM contra el virus dengue son marcadores serológicos ampliamente utilizados en el diagnóstico de la infección reciente por dengue, solo son detectables a partir de los 5 a 6 días del comienzo de los síntomas y pueden persistir hasta tres meses o más, lo que implica una demora del diagnóstico, además de la dificultad de definir la infección como reciente debido a su duración en sangre, sobre todo en aquellos países donde el dengue es endémico (209).

Para el siguiente análisis se procesaron 720 muestras de suero (**panel 6**), todas pertenecientes a casos confirmados de infección por virus dengue y colectadas entre los días 0 y 54 del inicio de los síntomas (figura III.5). Estos sueros se distribuyeron en función de diferentes rangos de días de colecta: 260 sueros entre 0-4 días (130 casos primarios y 130 secundarios); 230 sueros entre 5 y 7 días (85 casos primarios y 145 secundarios); 230 sueros entre 14-30 días (85 casos

primarios y 145 secundarios) y 43 sueros entre 31 y 54 días (11 casos primarios y 32 secundarios).

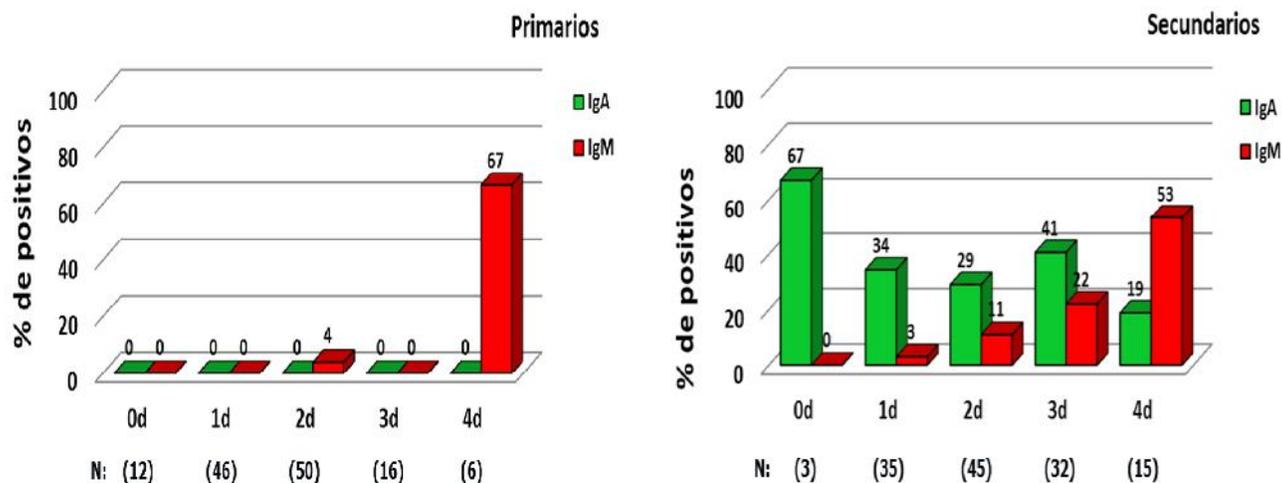


720 sueros de pacientes con dengue

**Figura III. 5. Porcentaje de muestras de suero positivas a IgA anti-dengue en pacientes con infección primaria o secundaria, colectadas en diferentes momentos de inicio de los síntomas.**

Como se muestra en el primer grupo de colecta (0-4 días), el porcentaje de detección de anticuerpos IgA anti-dengue para las muestras de casos primarios fue nulo no siendo así para los secundarios donde se obtuvo un 32,6 %, representando un porcentaje bajo de detección. En los demás grupos los porcentajes de detección de anticuerpos IgA anti-dengue se incrementaron significativamente ( $p=0.0000$ ) aunque se observa una caída de la IgA a medida que transcurre el tiempo y el paciente pasa a la etapa de convalecencia. En la comparación entre primarios y secundarios en sueros colectados con cinco o más días, no se encontró diferencias significativas en los porcentajes obtenidos ( $p > 0.05$ ).

El análisis de los anticuerpos IgA en muestras colectadas en los cuatro primeros días de infección, en relación a la respuesta de anticuerpos IgM se muestra en la figura III.6



**Figura III. 6. Porcentaje de positividad de anticuerpos IgA y IgM anti-dengue en muestras colectadas en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas para casos con infección primaria y secundaria.**

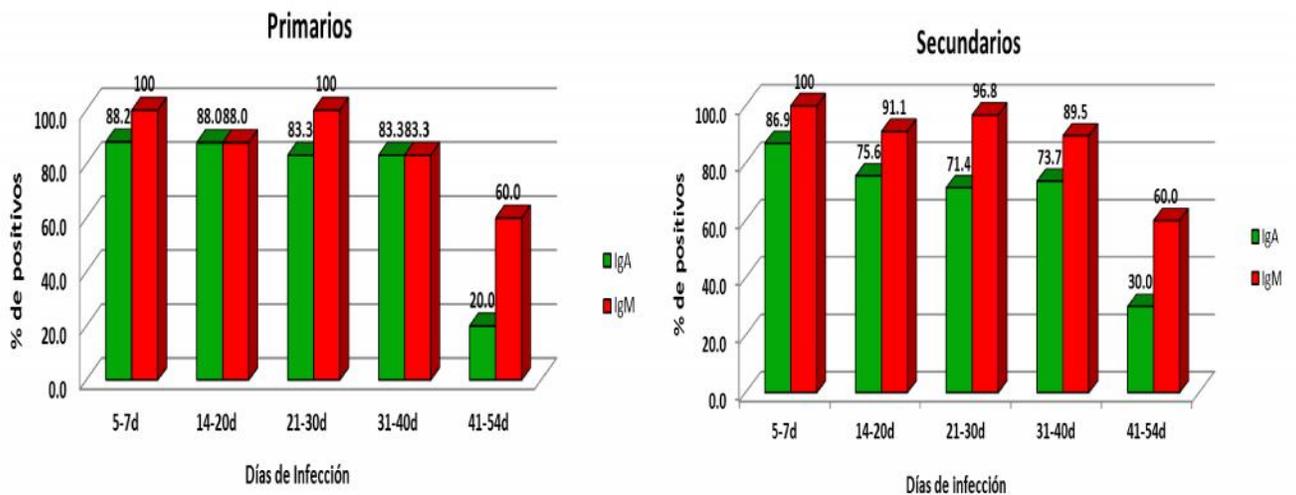
Como era de esperar, según la dinámica de la respuesta inmunológica de anticuerpos, en los casos de infección primaria la IgA anti-dengue no fue detectada, mientras que los anticuerpos IgM comienzan a ser detectables principalmente hacia un 4to día de inicio de los síntomas con el mayor porcentaje de detección (67%). En los casos con infección secundaria se observa una aparición bien temprana de la IgA desde el día 0 (67%), mostrándose porcentajes mayores con respecto a la IgM hasta el día 3 de colecta de la muestra.

Algunos autores han planteado que ante infecciones primarias los anticuerpos IgA contra dengue son detectados con posterioridad a la aparición de los anticuerpos IgM, los que generalmente se hacen detectables alrededor del 5to día del inicio de los síntomas, como reconocimiento y maduración de la respuesta inmune frente a una primera infección con el agente viral. Sin embargo en las infecciones secundarias el comportamiento de la IgA anti-dengue es análogo al comportamiento de los anticuerpos IgG, los cuales aparecen detectables en los primeros días de la fase aguda debido a un reconocimiento de epítopes comunes por parte de los clones de linfocitos B de memoria circulantes en la sangre, produciendo un

incremento temprano de estos anticuerpos y antes de la aparición de los anticuerpos IgM (23, 170).

El mecanismo de respuesta inmunológica de anticuerpos IgA de memoria pudiera explicarse de la siguiente manera: la inoculación del virus a través de la piel por parte de la picadura del mosquito infectado, se encuentra con una primera barrera inmunológica especializada que reside en la epidermis, que son las células dendríticas derivadas de la médula ósea, tales como las células de Langerhans (210). Estas células tienen una función de vigilantes inmunológicas, que cuando son activadas por el agente, migran desde la epidermis hacia los nódulos linfáticos, induciendo una fuerte respuesta antígeno específica de linfocitos T y B. Es muy común que esta estimulación antigénica ocurra en los órganos linfoides secundarios como el bazo, que es donde también se localizan las zonas vírgenes de células T y B, sin embargo una respuesta temprana puede tener lugar a nivel de órganos linfoides periféricos, llevada a cabo por linfocitos B diferenciados en sangre y productores de IgA (211, 212). Otra vía de respuesta inmunológica de IgA pudiera ser a partir de la activación local (epidermis) donde pueden participar clones de memoria de linfocitos T presentes en la piel en 1 millón/cm<sup>2</sup> y parte de las células B diferenciadas que se van acumulando sobre el tejido desde el torrente sanguíneo (213).

Al comparar los porcentajes de detección de la IgA con la IgM anti-dengue detectada por los ensayos de referencia en muestras colectadas después del 5to día de comienzo de los síntomas (figura III.7), se observaron, de forma global, porcentajes de anticuerpos IgM superiores y significativos tanto para casos de infección primaria ( $p=0,0021$ ) como secundaria ( $p=0,0001$ ), lo que sugiere que los anticuerpos IgM continúan siendo de preferencia en el diagnóstico serológico para muestras colectadas con cinco días o más de inicio de los síntomas.



**Figura III. 7. Porcentaje de positividad de anticuerpos IgA y IgM anti-dengue en muestras colectadas entre los días 5 y 54 de inicio de los síntomas, para casos con infección primaria y secundaria.**

También se observó una caída rápida de los porcentajes de anticuerpos IgA anti-dengue en las muestras colectadas entre los días 41 y 54 de inicio de los síntomas, lo que sugiere un tiempo de vida más corto de la IgA con respecto a la IgM, comportamiento que ha sido planteado por otros investigadores, y que apoya su valor como mejor marcador de infección reciente que la IgM (21, 214).

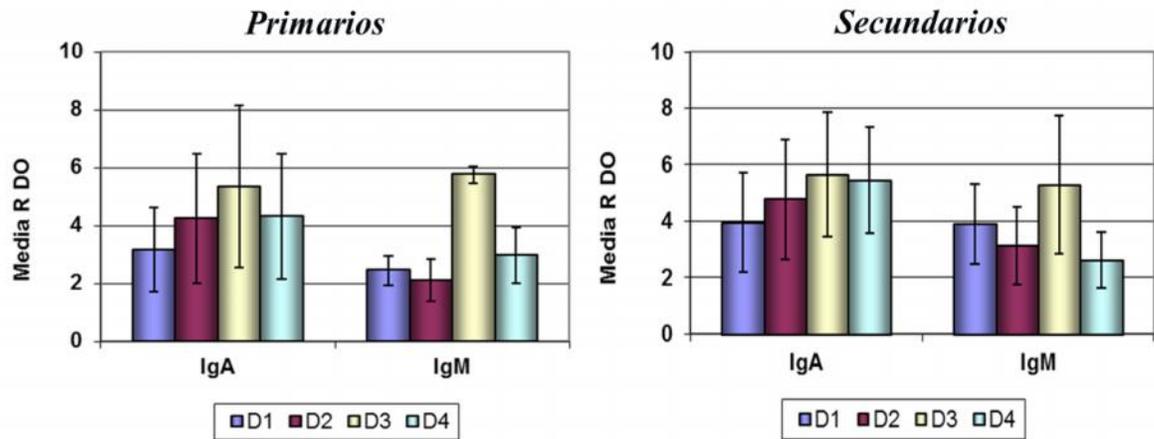
Los principales mecanismos de aclaramiento de los anticuerpos IgM de la sangre están dispuestos mediante la vía clásica de activación del sistema complemento y la fagocitosis mediante las células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (13). Si algunos de estos mecanismos se encuentran comprometidos durante la infección, ya sea por inhibición del sistema complemento o por infección de las células fagocitas por parte del virus, la presencia de los anticuerpos IgM permanece por un tiempo mayor en el suero del individuo infectado. Por otra parte, para los anticuerpos IgA se plantean dos posibles mecanismos de aclaramiento del suero, los cuales ocurren con una elevada efectividad: a través de los hepatocitos, en el reconocimiento de diferentes receptores celulares de membrana que permiten su internalización, con un posterior paso a la bilis, la cual transporta este

anticuerpo hacia el lumen del tubo digestivo; y el otro a través de las células del epitelio biliar donde si ha sido comprobado la expresión de un complejo secretor (CS) similar al obtenido en estudios de ratas que permite el tránsito de esta inmunoglobulina hacia la bilis, con igual disposición final (215). Estudios realizados por Nagura y col (1981) (216) y Delacroix y col (1981) (217) apoyan este criterio cuando observan elevadas concentraciones de IgA transferidas hacia la bilis en pocas horas y eliminadas hacia el duodeno.

La duración de este anticuerpo en sangre aún no ha sido determinada con seguridad, ya que existen contradicciones en los resultados obtenidos por diferentes autores. Nawa y col. 2005(214), Talarmin y col. 1998 (21) y Balmaseda y col. 2003(23) muestran presencia de anticuerpos IgA en sueros hasta los días 23, 40 y 78 del inicio de los síntomas respectivamente. Sería necesario estudiar muestras colectadas con más días de infección para así poder determinar el momento de aclaramiento de esta inmunoglobulina y poder establecer su duración en el tiempo.

### **III.10. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue en relación a la reactividad cruzada a los diferentes serotipos y al tipo de infección en muestras colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas mediante el sistema ELISA-IgA.**

Para valorar la reactividad cruzada de los anticuerpos IgA anti-dengue frente a los serotipos virales y en relación al tipo de infección, se trabajaron 34 muestras de sueros de pacientes con una infección confirmada de virus Den-3 (16 casos de infección primaria y 18 casos de infección secundaria) procedentes del **panel 4**. Se incluyó para el análisis la respuesta de reactividad cruzada de la IgM a los cuatro serotipos del dengue.



34 monosueros positivos a dengue

**Figura III. 8. Respuesta de anticuerpos IgA e IgM anti-dengue frente a los serotipos virales en muestras de suero colectados de casos primarios y secundarios a Den 3. Se incluye la media aritmética  $\pm$  desviación estándar.**

En la figura III.8 se muestra una elevada reactividad cruzada en la respuesta de IgA anti-dengue frente a los serotipos virales tanto para casos de infección primaria como secundaria, siendo mayor para este último. Al comparar la reactividad cruzada de los anticuerpos en casos primarios se observa el mayor valor de la media RDO al serotipo infectante Den-3 en la respuesta de IgA pero no se encontró diferencia significativa entre este serotipo y el Den-2 ( $p < 0.05$ ), contrario al análisis para los anticuerpos IgM donde se encontró una baja reactividad cruzada con diferencias significativas en la comparación de Den-3 con el resto de los serotipos ( $p < 0.001$ ). Sin embargo para casos secundarios, la respuesta de IgA muestra un incremento de la reactividad cruzada, no observándose significación entre Den-3 y los serotipos Den-2 ( $p = 0.1596$ ) y Den-4 ( $p = 0.4095$ ), a diferencia de la IgM, que aunque con un ligero incremento en la reactividad aun permitió la confirmación del serotipo infectante Den 3 ante el resto de los serotipos ( $p = 0.05$ ).

Este incremento de la reactividad cruzada de la IgA anti-dengue sugiere un comportamiento similar al de los anticuerpos IgG como ha sido planteado anteriormente. Es por ello, que la respuesta de anticuerpos IgA no pudiera utilizarse para identificar el serotipo causante de un

brote o epidemia en un grupo de sueros, como ha sido demostrado en estudios anteriores para los anticuerpos IgM (15, 218, 219).

El sistema ELISA-IgA permite la detección de los anticuerpos IgA antidengue en la fase febril temprana de la enfermedad pero para los casos con infección secundaria. En el presente estudio el porcentaje obtenido para estos casos fue bajo (32.6 %), considerándose un porcentaje no favorable para su inclusión como propuesta en un nuevo algoritmo diagnóstico. No obstante, se pudiera valorar su utilización para la definición de un caso secundario en la fase febril temprana, siempre utilizado en paralelo con un marcador diagnóstico que permita la confirmación de la infección por dengue, como la NS1 la cual ha demostrado su utilidad en los estudios realizados en la presente investigación, además ambos marcadores pueden ser trabajados sobre la misma metodología de ensayos inmunoenzimáticos. También tener en cuenta, que aunque los anticuerpos IgG han sido descritos como los mayoritarios en el suero y pueden ser detectados en bajos títulos para casos secundarios en la fase temprana, el sistema MEI utilizado actualmente en el país como referencia, está desarrollado para la confirmación y definición del tipo de infección en sueros pareados, por tanto sería una alternativa la utilización de los anticuerpos IgA en la etapa temprana definiendo infección secundaria.

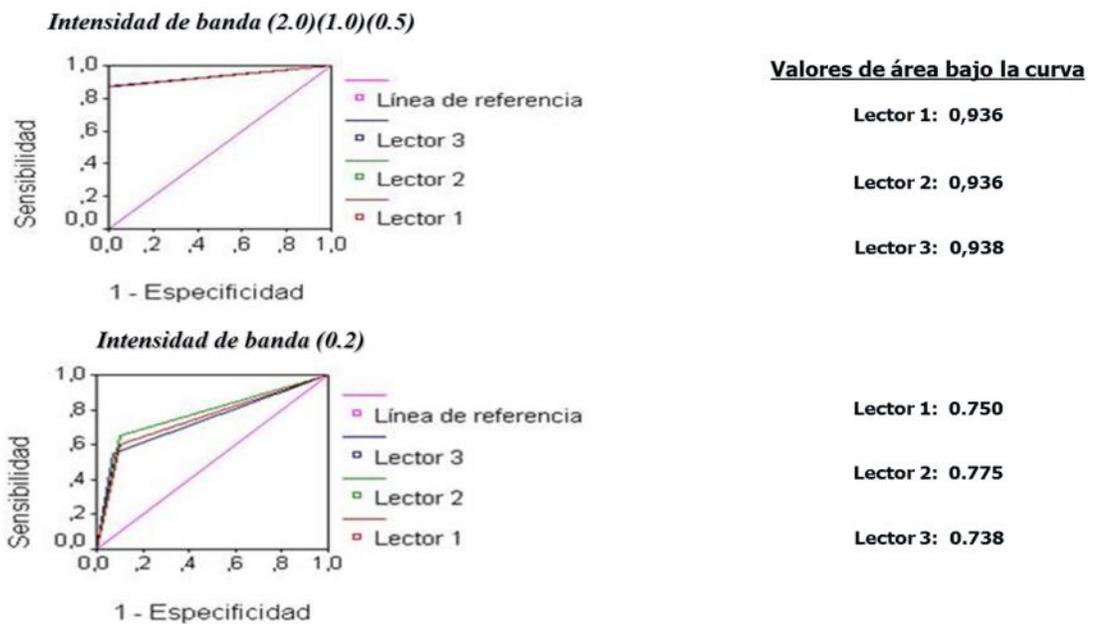
### **III.11. Evaluación de los anticuerpos IgA a virus dengue en relación al momento de colecta de la muestra y el tipo de infección en muestras colectadas entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas mediante el sistema comercial MPD-IgA.**

Para el estudio de la respuesta de anticuerpos IgA anti-dengue según el tipo de infección (primaria o secundaria) se analizaron los resultados obtenidos para los tres lectores (promedio de las 3 lecturas) mediante el sistema MPD-IgA con respecto a los diferentes niveles de intensidad de banda mostrados por la escala proporcionada.

Como muestra la figura III.9, la media aritmética determinada para los valores de intensidad de banda, mostró el mayor valor para los casos con infección secundaria (0,76) con respecto a los casos con infección primaria (0,55), con un análisis estadístico significativo entre ambos grupos ( $p = 0,013$ ). Los valores sugieren una detección mayor de casos secundarios que



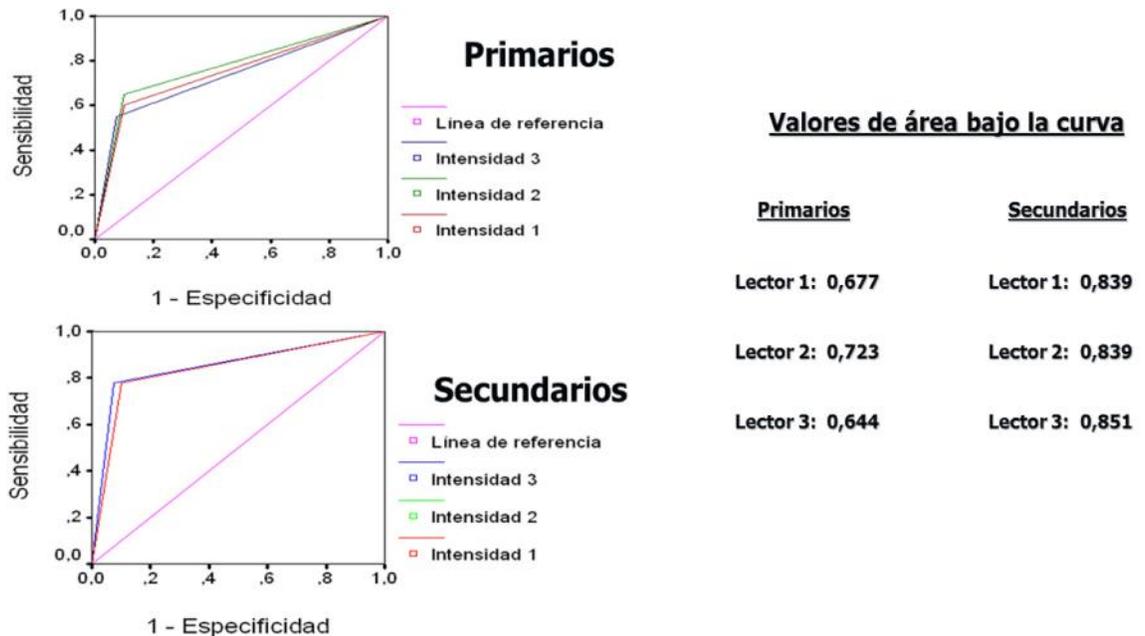
demuestra una capacidad discriminatoria regular para esta intensidad, siendo indicativo de una afectación de la sensibilidad del sistema MPD-IgA que pudiera dar lugar a la existencia de casos discordantes (falsos positivos y falsos negativos) como fue observado por los lectores, además define a la intensidad de 0,2 como un punto crítico de discriminación de casos positivos y negativos.



**Figura III. 10. Curva ROC obtenida en la comparación de los resultados entre los tres lectores para las diferentes intensidades de banda establecidas por el patrón del sistema MPD-IgA.**

De esta manera se repite el análisis para la intensidad de banda de 0,2 pero en función del tipo de infección (figura III.11), obteniendo un área bajo la curva para cada lector de 0,677 (CI 95%: 0,478-0,877), 0,723 (CI 95%: 0,530-0,915) y 0,644 (CI 95%:0,441-0,848) para los casos primarios y de 0,839 (CI 95%:0,670-1,000), 0,839 (CI 95%:0,670-1,000) y 851 (CI 95%: 0,683-1,000) para los casos secundarios, lo que señala una capacidad discriminatoria de regular para el grupo de pacientes de infección primaria a dengue y de buena para el grupo de

pacientes con infección secundaria, favoreciéndose así la detección de anticuerpos IgA anti-dengue para casos con infección secundaria.



**Figura III. 11. Curva ROC obtenida en la comparación de los resultados entre los tres lectores para casos primarios y secundarios, a la intensidad de banda de 0,2.**

El sistema inmunocromatográfico MPD-IgA fue evaluado en función de muestras colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas, observando valores favorables de sensibilidad y especificidad para este tipo de formato de prueba rápida. También los niveles de detección de los anticuerpos IgA anti-dengue en casos secundarios se favorecen en la lectura de la intensidad de banda crítica de 0,2.

Sería interesante completar la evaluación de este sistema utilizando muestras colectadas en la etapa temprana de la infección y comparar los resultados con los obtenidos por el sistema ELISA-IgA, ya que no fue posible contar con más determinaciones del estuche evaluado.

Tanto el sistema ELISA-IgA como el MPD-IgA son aceptables para la detección de anticuerpos IgA en muestras colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas.

### **III.12. Propuesta de algoritmo diagnóstico en función de los resultados obtenidos de la evaluación de la proteína viral NS1 y de los anticuerpos IgA como marcadores de la infección temprana a virus dengue. Discusión General.**

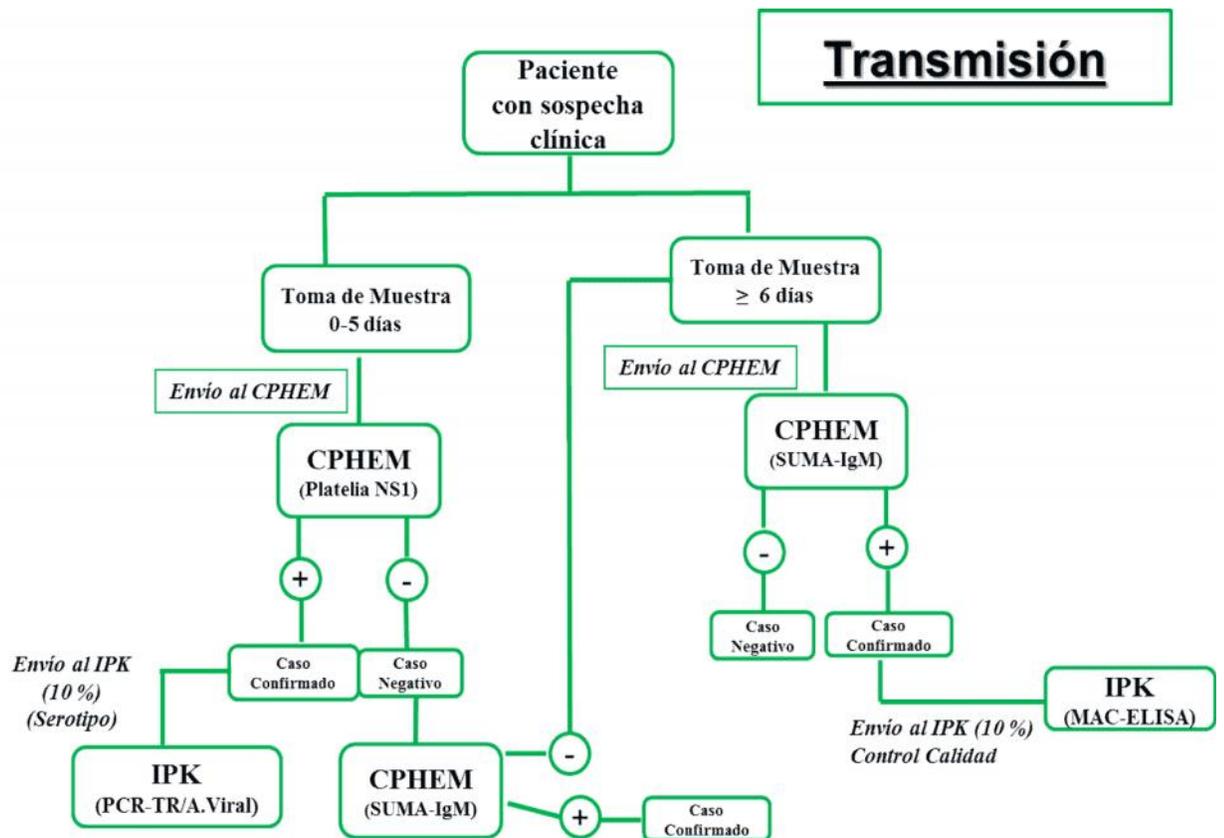
El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica y dinámica. La infección puede cursar en forma asintomática o expresarse con un espectro clínico amplio que incluye las expresiones graves y las no graves (10). Después del periodo de incubación y durante la fase febril temprana, correspondiente a los primeros 4 días de comenzados los síntomas, el virus o proteínas asociadas a esta entidad viral, pueden ser detectados en la sangre del paciente infectado. Es este momento donde son aplicados ensayos como la PCR-TR y el A Viral para la detección del genoma o la partícula viral (220).

Hacia el 5to día del inicio de los síntomas, comienzan a detectarse los diferentes anticuerpos producidos contra el virus infectante, en donde los isotipos IgM e IgG han sido considerados los de mayor importancia desde el punto de vista de protección o inmunopatogenia. En infecciones primarias los anticuerpos IgM se detectan hacia el 5to día, declinando hacia niveles no detectables entre los días 30 y 90, mientras que los anticuerpos IgG comienzan a ser detectables hacia el 10mo día, alcanzando los valores máximos hacia los días 15-21 y permaneciendo detectables durante toda la vida. En el transcurso de la infección secundaria, los anticuerpos IgM pueden ser variables en dependencia del cuadro clínico desarrollado (15, 218), pero se acentúa la presencia de anticuerpos IgG, los cuales son detectados en la fase temprana de la enfermedad y se elevan rápidamente, permaneciendo elevados durante varias semanas y declinando posteriormente hasta niveles basales (116). Tanto los anticuerpos IgM como los IgG son detectados principalmente mediante sistemas ELISA. Todos estos métodos virológicos y serológicos forman parte del algoritmo diagnóstico del dengue que se lleva a cabo en nuestro país.

Los métodos utilizados en el presente trabajo para la determinación de la proteína NS1 mostraron resultados favorables para su posible inclusión en el algoritmo diagnóstico. El sistema Platelia NS1 presentó una sensibilidad más elevada que la obtenida por la prueba rápida SD Duo, con niveles de detección similares al sistema de referencia RT-PCR, por lo que sería el mejor candidato para ser utilizado. Por otra parte sería recomendable en estudios posteriores evaluar el sistema SD Duo con la inclusión de la determinación de los marcadores serológicos IgM e IgG pues como ha sido reportado por otros autores la sensibilidad global tiende a incrementarse con la combinación de la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG (NS1/IgM/IgG) (175, 192).

Respecto a los sistemas evaluados para la detección de los anticuerpos IgA anti-dengue, se conoce que los anticuerpos no pueden ser marcadores de inicio de enfermedad al menos en infecciones primarias, donde tiene lugar la respuesta inmune innata en primera instancia. Para infecciones secundarias ya aparece una respuesta de memoria de anticuerpos que se produce ante el estímulo antigénico. El sistema ELISA-IgA mostró una baja detección en la etapa temprana de la enfermedad y solo para casos secundarios, por lo que no se recomienda incluirlo en esta propuesta de algoritmo diagnóstico, aunque podría valorarse su posible utilización en la definición temprana de una infección secundaria. Con relación al sistema de tira rápida MPD-IgA no fue posible su evaluación en la etapa temprana de la enfermedad, aunque mostró muy buenos valores de sensibilidad y especificidad para muestras colectadas entre los días 5 y 7 del inicio de los síntomas, similar al sistema ELISA-IgA, por lo que ambos ensayos pueden ser valorados para estudios relacionados con: la duración de estos anticuerpos en el tiempo, detección temprana en muestras no invasivas como la orina y la saliva y estudios relacionados con su papel en la patogenia de la infección por virus dengue.

Teniendo en cuenta todos los criterios anteriores como nueva propuesta se considera mantener el diagnóstico serológico como soporte de la vigilancia de laboratorio de dengue en **periodos de no transmisión** y proponer en **periodos de transmisión**, la inclusión del sistema Platelia NS1 en el algoritmo diagnóstico a nivel de los CPHEM, como se muestra en la figura III.12.



**Figura III. 12. Propuesta de algoritmo diagnóstico de la vigilancia de laboratorio de dengue en periodo de transmisión.**

Como se observa, los días de colecta de las muestras para la detección de la proteína NS1 se consideraron entre los días 0 y 5 de inicio de los síntomas, ya que los porcentajes de detección de la proteína NS1 se mantuvieron favorables en más de un 50 % tanto para casos primarios como secundarios, aumentando la probabilidad de detección y confirmación de un caso.

Es de señalar que el sistema Platelia necesita de condiciones de laboratorio para su desarrollo, las cuales pueden ser encontradas en los laboratorios SUMA, localizados en los CPHEM creados por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP).

Una de las limitantes del sistema seleccionado es que no es capaz de definir el serotipo infectante en el paciente y dada la importancia de conocer el o los serotipos circulantes en un

brote o epidemia como objetivo fundamental de la vigilancia de laboratorio, se considera seleccionar un 10 % de los casos que resulten positivos por el ensayo de NS1, los cuales serían enviados al LNR-IPK con el objetivo de determinar el serotipo o los serotipos virales circulantes mediante los métodos de PCR-TR y AViral.

Por otra parte, los casos que resulten negativos por Platelia NS1 no deben considerarse como casos no dengue, sobre todo de existir una fuerte sospecha clínica de la enfermedad. Para ello se considera procesar esa primera muestra por el sistema SUMA-IgM, donde las que resulten positivas se confirmarían como casos de dengue, mientras que las negativas se incluirían como parte de la vigilancia serológica con la colecta de una segunda muestra de suero con 6 días o más de inicio de los síntomas.

En las segundas muestras colectadas al 6to día de inicio de los síntomas, de aquellos casos que resulten negativos por el sistema Platelia, se confirmarían a nivel de los CPHEM mediante el SUMA-IgM como ya ha sido establecido en periodos de transmisión. Solo un 10 % de los casos positivos se enviarían al IPK como control de calidad. Hay que tener en cuenta que algunos pacientes pudieran presentarse en consulta médica con una sospecha de dengue pero en días avanzados de la infección, donde la colecta de la muestra se realizaría hacia un 6to día de inicio de los síntomas. En estos casos, la muestra entraría directamente a la vigilancia serológica y se confirmaría el caso o no como está establecido.

La detección de la proteína viral NS1 tiene una gran importancia en la obtención de una rápida y temprana confirmación de un caso, que no solo permitiría un buen enfoque clínico hacia el mejor abordaje del paciente, sino que apoyaría el trabajo epidemiológico temprano, de manera que se pudieran identificar áreas en transmisión y así trazar estrategias más efectivas para un corte rápido de esta, incidiendo sobre el vector de la enfermedad.

# *CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES.

- ✓ Los sistemas comerciales PlateliaNS1 y SD Duo para la detección de la proteína viral NS1 muestran buenos parámetros de desempeño permitiendo su utilización como sistemas diagnósticos tempranos.
- ✓ Ambos sistemas demostraron los mayores porcentajes de detección de la proteína NS1 en los primeros cuatro días de inicio de los síntomas, permitiendo incorporar un 5to día de detección y ampliando la posibilidad de confirmación de un caso de dengue.
- ✓ La detección de la proteína NS1 como marcador temprano de la infección por virus dengue se consideró satisfactoria para su incorporación en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad mediante el sistema Platelia NS1.
- ✓ Los sistemas ELISA-IgA y MPD-IgA para la detección de los anticuerpos IgA muestran buenos parámetros de desempeño.
- ✓ La detección de los anticuerpos IgA como marcador temprano de la infección por virus dengue no se consideró satisfactoria para su incorporación en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad.
- ✓ La nueva propuesta de algoritmo permitirá, de manera general, brindar un diagnóstico temprano y rápido, lo cual contribuirá a un mejor manejo del paciente y al control de la transmisión en el país.

# *RECOMENDACIONES*

## RECOMENDACIONES.

- ✓ Valorar la utilización del sistema comercial SD Dengue Duo a niveles primarios y secundarios de salud, completando el estudio con los marcadores de IgM e IgG para incrementar sensibilidad del sistema.
- ✓ Desarrollar un estudio para valorar si es útil el tratamiento ácido (Glicina 1.5M) en muestras tempranas de pacientes con infección secundaria a virus dengue que permita un incremento en la positividad de la proteína NS1 por los sistemas comerciales evaluados.
- ✓ Completar el estudio de los anticuerpos IgA con el sistema comercial MPD-IgA en muestras tempranas y comparar con el resultado obtenido por el sistema ELISA-IgA.
- ✓ Disponer de ambos sistemas de detección de anticuerpos IgA para estudios de investigación donde estén involucrados estos anticuerpos.

*REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

1. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of virology*. 2013;158(7):1445-59.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
3. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):816-20.
4. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, Martinez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991;86(3):367.
5. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Pan American journal of public health*. 2002;11(4):223-7.
6. Guzman MG, Pelaez O, Kouri G, Quintana I, Vazquez S, Penton M, et al. [Final characterization of and lessons learned from the dengue 3 epidemic in Cuba, 2001-2002]. *Pan American journal of public health*. 2006;19(4):282-9.
7. Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez M, Rosario D, Pelaez O, et al. Epidemiological studies on dengue virus type 3 in Playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2012;16(3):e198-203.
8. OPS. EER Noticias: Enfermedades Infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. EER Noticias. 2006.
9. Guzman MG, Vazquez S. [Notes on the laboratory diagnosis of dengue virus]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2002;54(3):180-8.
10. WHO/TDR. Dengue case classification. *Dengue, guidelines for diagnosis treatment, prevention and control*. Geneva, 2009. p:1-146.
11. Guzman MG, Pelegrino JL, Pumariega T, Vazquez S, Gonzalez L, Kouri G, et al. [Quality control of the serological diagnosis of dengue in laboratories throughout the Americas, 1996-2001]. *Pan American journal of public health*. 2003;14(6):371-6.
12. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed research international*. 2015; 2015:834371.

13. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*. 2013;98(2):192-208.
14. Laferte J, Pelegrino J, Guzman M, Gonzalez G, Vazquez S, Hermida C. Rapid diagnosis of dengue virus infection using a novel 10 ul IgM antibody capture ultramicroELISA assay (MAC UMELISA Dengue). *Adv Mod Biotech*. 1992;1(19).
15. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;33(2):132-7.
16. Vazquez S, Acosta N, Ruiz D, Calzada N, Alvarez AM, Guzman MG. Immunoglobulin G antibody response in children and adults with acute dengue 3 infection. *Journal of virological methods*. 2009;159(1):6-9.
17. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(2):376-81.
18. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:1185-9.
19. Vazquez S, Ruiz D, Barrero R, Ramirez R, Calzada N, del Rosario Pena B, et al. Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;68(1):46-9.
20. Yap G, Sil BK, Ng LC. Use of saliva for early dengue diagnosis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(5):e1046.
21. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(5):1189-92.
22. Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(12):4332-8.
23. Balmaseda A, Guzman MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Tellez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(2):317-22.

24. Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons RV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP, Jr., Nisalak A, et al. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clinical and vaccine immunology* : CVI. 2012;19(5):804-10.
25. Blacksell SD. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012; 2012:151967.
26. Escalier HCR. Respuesta de anticuerpos IgA en pacientes con infección primaria y secundaria a virus dengue 3 La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" 2011.
27. Chen R, Vasilakis N. Dengue - Quo tu et quo vadis? *Viruses* 2011;3:1562-608.
28. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Kuno DJGaG, editor. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Chapter 1. New York USA: Cab International. 1997; p:1-22.
29. Rush AB. An account of the bilious remitting fever as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. *Medical Inquiries and Observations* Prichard & Hall. 1789:104-17.
30. Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *Journal of Tropical Medicine (London)*. 1903;6:209.
31. Rigau-Perez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;59(2):272-4.
32. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1952;1(1):30-50.
33. Hammon WM, Sather GE. Virological Findings in the 1960 Hemorrhagic Fever Epidemic (Dengue) in Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1964;13:629-41.
34. Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 1993;193(2):888-99.
35. Blok J, McWilliam SM, Butler HC, Gibbs AJ, Weiller G, Herring BL, et al. Comparison of a dengue-2 virus and its candidate vaccine derivative: sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. *Virology*. 1992;187(2):573-90.
36. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993;197(1):216-24.

37. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*. 1990;44:649-88.
38. Mairuhu AT, Wagenaar J, Brandjes DP, Van Gorp EC. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004.
39. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25.
40. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1990;3(4):376-96.
41. Barth OM. Ultrastructural aspects of the dengue virus (flavivirus) particle morphogenesis. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*. 1999;31(3):407-12.
42. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences (CMLS)*. 2010;67(16):2773-86.
43. Heinz FX, Allison SL, Stiasny K, Schalich J, Holzmann H, Mandl CW, et al. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 1995;13(17):1636-42.
44. Osatomi K, Sumiyoshi H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*. 1990;176(2):643-7.
45. Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol*. 1995;69(9):5816-20.
46. Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Archives of virology*. 2005;150(4):771-86.
47. Schlesinger JJ, Chapman SE. Influence of the human high-affinity IgG receptor FcγRI (CD64) on residual infectivity of neutralized dengue virus. *Virology*. 1999;260(1):84-8.
48. Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(11):1603-10.
49. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of virology*. 1999;73(7):6104-10.

50. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(3):1053-7.
51. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(8):1165-8.
52. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Archives of virology*. 1997;142(5):897-916.
53. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiao AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *Journal of immunology*. 2005;174(1):395-403.
54. Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *Journal of medical virology*. 2003;69(1):82-90.
55. Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *Journal of immunology*. 2002;169(2):657-64.
56. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *The Journal of general virology*. 1997;78 ( Pt 9):2279-84.
57. Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology*. 1989;169(1):100-9.
58. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knippe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 1. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001; p:991-1042.
59. Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*. 1989;171(2):637-9.
60. Yamshchikov VF, Compans RW. Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol*. 1994;68(9):5765-71.
61. Murthy HM, Clum S, Padmanabhan R. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling

- and structural analysis of mutational effects. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(9):5573-80.
62. Ng ML, Lau LC. Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Arch Virol*. 1988;100(3-4):199-211.
63. Myint KS, Nisalak A, Kalayanarooj S. Six hour confirmation of dengue. Antigen detection in peripheral blood mononuclear cells by immunohistochemistry. *Am JTropHyg*. 1991;45:173-81.
64. Randolph VB, Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol*. 1990;71(Pt 8):1845-50.
65. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol*. 2008;3:155-65.
66. Putnak R, Feighny R, Burrous J, Cochran M, Hackett C, Smith G, et al. Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;45(2):159-67.
67. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology*. 1996;216(2):317-25.
68. Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Archives of virology*. 1993;128(1-2):111-21.
69. Raviprakash K, Sinha M, Hayes CG, Porter KR. Conversion of dengue virus replicative form RNA (RF) to replicative intermediate (RI) by nonstructural proteins NS-5 and NS-3. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;58(1):90-5.
70. Vaughn DW, Hoke CH, Jr., Yoksan S, LaChance R, Innis BL, Rice RM, et al. Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine*. 1996;14(4):329-36.
71. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):365-75.
72. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, editor. *Virology*. 1. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996; p: 961-1034.
73. Heinz FX, Kunz C. Protease treatment and chemical crosslinking of a flavivirus: tick borne encephalitis virus. *Arch Virol*. 1979;60(3-4):207-16.

74. Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BM, editor. *Virology*. 1. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996; p:931-60.
75. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(1):164-9.
76. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1996;3(6):621-7.
77. Wichmann O, Gascon J, Schunk M, Puente S, Siikamaki H, Gjorup I, et al. Severe dengue virus infection in travelers: risk factors and laboratory indicators. *J Infect Dis*. 2007;195(8):1089-96.
78. Martinez E. Dengue. *Estudios Avancados*. 2008;22(64):33-52.
79. Wilder-Smith A, Eong Ooi E, Vasudevan SG, Gubler DJ. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. *Curr Infect Dis Rep*. 2010;12:157-64.
80. WHO. *Dengue Hemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva. 1997:1-84.
81. Jacobs M. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(1):7-8.
82. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7-S16.
83. Guzman MG. Dengue Vaccines: New Developments. *Drugs of the Future* 2011;36(1):45-62.
84. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977. *PAHO*. 1978;375:40-3.
85. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67(4):375-80.
86. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiologia del dengue y del dengue hemorragico en Santiago de Cuba, 1997. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica*. 1999;6(1):16-25.
87. Pelaez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, Martín JLS, Vázquez S, et al. Dengue 3 epidemic in Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(4):219-22.

88. Guzman MG, Kouri G. Dengue in Cuba: research strategy to support dengue control. *Lancet*. 2009;374(9702):1660-1.
89. Who. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *The Nursing journal of India*. 2006;97(11):246-7.
90. Halstead SB. Dengue. *Current opinion in infectious diseases*. 2002;15(5):471-6.
91. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96.
92. Lum LC, Suaya JA, Tan LH, Sah BK, Shepard DS. Quality of life of dengue patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78(6):862-7.
93. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453-65.
94. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2012.
95. Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(11):e1397.
96. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 1970;42(5):350-62.
97. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *Journal of virology*. 2002;76(19):9877-87.
98. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and cell biology*. 2007;85(1):43-5.
99. Halstead SB, Larsen K, Kliks S, Peiris JS, Cardoso J, Porterfield JS. Comparison of P388D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue-2 infection-enhancing antibodies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1983;32(1):157-63.
100. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1113-7.

101. Rothman AL, Kurane I, Ennis FA. Multiple specificities in the murine CD4+ and CD8+ T-cell response to dengue virus. *Journal of virology*. 1996;70(10):6540-6.
102. Mangada MM, Ennis FA, Rothman AL. Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *Journal of immunological methods*. 2004;284(1-2):89-97.
103. Brown MG, King CA, Sherren C, Marshall JS, Anderson R. A dominant role for Fc{gamma}RII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J Leukoc Biol*. 2006.
104. Young PR. Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1990;21(4):646-51.
105. Guzman MG, Kouri G, Halstead SB. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet*. 2000;355(9218):1902-3.
106. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):821-3.
107. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(6):522-3.
108. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006.
109. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(3):287-99.
110. Limonta D, Capro V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(1):50-4.
111. Turner M. Antibodies. *Immunology* ed I Roitt, J Brostoff and D Male. 2001:65-76.
112. Frazer K, Capra D. Immunoglobulins: Structure and Function. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Chapter 3: Lippincott-Raven-Publisher; 1999.
113. Koraka P, Murgue B, DeParis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp EC, et al. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *Journal of medical virology*. 2003;70(1):91-8.
114. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during Dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol*. 2005;33(2):132-7.

115. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2004;8(2):69-80.
116. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1989;40(4):418-27.
117. Castellanos Y. Estudio de la respuesta inmune humoral en niños salvadoreños con infección a virus dengue 4 [Tesis de Diploma]. Ciudad de la Habana: Facultad de Biología, Universidad de la Habana; 2005.
118. Guzman MG, Rosario D, Kouri G. Diagnosis of dengue virus infection. In: Kalitzky M, Borowski P, editors. *Molecular Biology of the flavivirus*. Chapter 7. Norfolk: Horizon Bioscience; 2006. p. 191-223.
119. Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien E, Deubel V, Vorndam V, et al. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 1999;1(13):1085-90.
120. Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Reaccion en cadena de la polimerasa para la deteccion rapida y determinacion del serotipo de virus del dengue en muestras clinicas. [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;4(1):1-5.
121. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
122. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of virological methods*. 1991;33(1-2):101-13.
123. Vazquez S, Cabezas S, Perez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *IJID*. 2007;11:256-62.
124. Brandt WE, Cardiff RD, Russell PK. Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. *Journal of Virology*. 1970;6(4):500-6.
125. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of virological methods*. 1994;48(2-3):237-44.
126. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology journal*. 2010;7:22.

127. Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology journal*. 2009;6:10.
128. Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(9):1044-51.
129. Hogrefe WR, Moore R, Lape-Nixon M, Wagner M, Prince HE. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4641-8.
130. Chow L, Sun HC, Chen HY, Lin SY, Wu JS. Detection and differentiation of dengue-1 from Japanese encephalitis virus infections by ABC MAC-ELISA. *Chinese journal of microbiology and immunology*. 1992;25(3):172-80.
131. Avrameas S. Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *J Immunol Methods*. 1992;150:23-32.
132. de Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires AR, Nuovo GJ. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2006;15(4):223-8.
133. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(8):1411-8.
134. Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;61(6):994-1000.
135. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(9):e1309.
136. Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. *PloS one*. 2014;9(11):e113411.
137. Wong WR, Sekaran SD, Mahamd Adikan FR, Berini P. Detection of dengue NS1 antigen using long-range surface plasmon waveguides. *Biosensors & bioelectronics*. 2016;78:132-9.

138. Sinawang PD, Rai V, Ionescu RE, Marks RS. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. *Biosensors & bioelectronics*. 2016;77:400-8.
139. Zhang H, Li W, Wang J, Peng H, Che X, Chen X, et al. NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis. *International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;26:57-66.
140. Buchy P, Peeling R. Laboratory diagnosis and diagnostic test. In: TDR/OMS, editor. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Chapter 4. Third Edition ed2009.
141. Guzman MG, Vazquez S. Apuntes sobre el diagnóstico del laboratorio del virus dengue. *Rev Cub Med Trop*. 2002;54(3):180-8.
142. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1958;7:561-73.
143. PAHO. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Scientific Publication, Pan American Health Organization. 1994;548.
144. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research*. 2003;60:421-67.
145. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Deteccion de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. [Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper]. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;3(3):174-8.
146. Lam SK, Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clinical and diagnostic virology*. 1998;10(1):75-81.
147. Parida MM, Upadhyay C, Saxena P, Dash PK, Jana AM, Seth P. Evaluation of a dipstick ELISA and a rapid immunochromatographic test for diagnosis of Dengue virus infection. *Acta virologica*. 2001;45(5-6):299-304.
148. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(12):3737-9.
149. Acosta N. Estudios de la respuesta de anticuerpos IgG en diferentes grupos poblacionales [Tesis de Diploma]. Ciudad de la Habana: Facultad de Biología, Universidad de la Habana; 2006.

150. Tio PH, Malasit P. Anti-dengue IgG detection by an indirect ELISA. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1995;26(4):673-6.
151. Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 1999;14(3):183-9.
152. Vazquez S, Fernandez R. [Use of an inhibition method of ELISA in the serologic diagnosis of dengue. Preliminary report]. *Rev Cubana Med Trop*. 1989;41(1):18-26.
153. Palmer CJ, King SD, Cuadrado RR, Perez E, Baum M, Ager AL. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio Rapid Immunochromatographic Test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(5):1600-1.
154. Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of ELISA-based serodiagnosis of dengue fever in travelers. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2000;19(3):169-73.
155. Vazquez S, Lemos G, Pupo M, Ganzon O, Palenzuela D, Indart A, et al. Diagnosis of dengue virus infection by the visual and simple AuBioDOT immunoglobulin M capture system. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(6):1074-7.
156. Mondesire RR. Commercial kits and reagents. Geneva, Switserland: WHO/TDR, 2004 4-6 october. Report No.: TDR/IRM/DIAG/DEN/05.1.
157. Dash PK, Sharma S, Srivastava A, Santhosh SR, Parida MM, Neeraja M, et al. Emergence of dengue virus type 4 (genotype I) in India. *Epidemiology and infection*. 2011;139(6):857-61.
158. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(8):895-907.
159. Patramool S, Bernard E, Hamel R, Natthanej L, Chazal N, Surasombatpattana P, et al. Isolation of infectious chikungunya virus and dengue virus using anionic polymer-coated magnetic beads. *Journal of virological methods*. 2013;193(1):55-61.
160. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):738-9.
161. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):2047-52.

162. Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(11):4119-24.
163. Yong YK, Thayan R, Chong HT, Tan CT, Sekaran SD. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore medical journal*. 2007;48(7):662-8.
164. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of biosciences*. 2008;33(4):617-28.
165. Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43(8):1023-30.
166. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Yoksan S, Flamand M, Sakuntabhai A. Dengue nonstructural protein 1 antigen in the urine as a rapid and convenient diagnostic test during the febrile stage in patients with dengue infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;71(4):467-9.
167. Araujo FM, Brilhante RS, Cavalcanti LP, Rocha MF, Cordeiro RA, Perdigao AC, et al. Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods*. 2011;177(1):128-31.
168. Schmidt-Chanasit J, Tenner-Racz K, Poppert D, Emmerich P, Frank C, Dinges C, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever imported into Germany. *Infection*. 2012;40(4):441-3.
169. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Limonta D, dos Santos FB. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(5):e1147.
170. Vazquez S, Cabezas S, Perez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2007;11(3):256-62.
171. Izquierdo A, Garcia A, Lazo L, Gil L, Marcos E, Alvarez M, et al. A tetravalent dengue vaccine containing a mix of domain III-P64k and domain III-capsid proteins induces a protective response in mice. *Archives of virology*. 2014;159(10):2597-604.
172. Izquierdo A, Valdes I, Gil L, Hermida L, Gutierrez S, Garcia A, et al. Serotype specificity of recombinant fusion protein containing domain III and capsid protein of dengue virus 2. *Antiviral research*. 2012;95(1):1-8.

173. Hermida Diaz C, Pupo M, Guzman Tirado MG, Gonzalez Garriga M, Marcet Sanchez R. [Use of a dengue anti-complex monoclonal antibody in viral purification]. *Revista cubana de medicina tropical*. 1992;44(3):171-6.
174. Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(4):642-50.
175. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology journal*. 2010;7:361.
176. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(11):1185-9.
177. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(9):4154-9.
178. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyakarnsakul W, Chakorn T, et al. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008;60(4):387-91.
179. Shan X, Wang X, Yuan Q, Zheng Y, Zhang H, Wu Y, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of nonstructural protein 1 Ag-based tests for dengue virus in Asian population: a meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2015;15:360.
180. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(8):e280.
181. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(7):e738.
182. Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Binh TQ, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;63(4):372-8.
183. McBride WJ. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;64(1):31-6.
184. Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *Journal of virological methods*. 2007;140(1-2):75-9.

185. Phommasone K, Sengvilaipaseuth O, de Lamballerie X, Vongsouvath M, Phonemixay O, Blacksell SD, et al. Temperature and the field stability of a dengue rapid diagnostic test in the tropics. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(1):33-9.
186. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(3):436-40.
187. Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC infectious diseases*. 2010;10:142.
188. Wang SM, Sekaran SD. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;83(3):690-5.
189. Gan VC, Tan LK, Lye DC, Pok KY, Mok SQ, Chua RC, et al. Diagnosing dengue at the point-of-care: utility of a rapid combined diagnostic kit in Singapore. *PloS one*. 2014;9(3):e90037.
190. LA S-V, Sánchez-Marce EE, Vivanco-Cid H. Evaluation of the SD BIOLINE Dengue Duo rapid test in the course of acute and convalescent dengue infection in a Mexican endemic region. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;8(4):368-72.
191. Erra EO, Korhonen EM, Voutilainen L, Huhtamo E, Vapalahti O, Kantele A. Dengue in Travelers: Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia and Their Associations with Clinical Parameters. *PloS one*. 2013;8(6):e65900.
192. Vickers IE, Harvey KM, Brown MG, Nelson K, DuCasse MB, Lindo JF. The performance of the SD BIOLINE Dengue DUO(R) rapid immunochromatographic test kit for the detection of NS1 antigen, IgM and IgG antibodies during a dengue type 1 epidemic in Jamaica. *Journal of biomedical science*. 2015;22:55.
193. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(1):e360.
194. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeueng N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(7):e1244.
195. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and

secondary dengue virus infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(4):622-30.

196. Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virology journal*. 2011;8:47.

197. B W, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, H. R. Hepatitis B virus markers in anti -HBc only positive individuals. *J Med Virol*. 2001 64(3):312-9.

198. PANAKITSUWAN S, YOSHIHARA N, HASHIMOTO N, MIYAMURA K, CHOTPITAYASUNONDH T. Early Diagnosis of Vertical HIV Infection in Infants by Rapid Detection of Immune Complex-Dissociated HIV p24 Antigen. *AIDS PATIENT CARE and STDs*. 1997;11(6).

199. Troisi C, Hollinger F. Detection of antibodies to hepatitis C virus in seronegative patients using an immune complex dissociation assay. *Journal of Viral Hepatitis*. 1997;4:383-6.

200. Shen WF, Galula JU, Chang GJ, Wu HC, King CC, Chao DY. Improving dengue viral antigens detection in dengue patient serum specimens using a low pH glycine buffer treatment. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2015; DOI 10.1016/j.jmii.2015.05.008.

201. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(8).

202. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala AM, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;61(3):353-8.

203. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Perez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;43(3):287-91.

204. De Decker S, Vray M, Sistek V, Labeau B, Enfissi A, Rousset D, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of a new dengue IgA capture assay (Platelia Dengue IgA Capture, Bio-Rad) for dengue infection detection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003596.

205. Ahmed F, Mursalin H, Alam MT, Amin R, Sekaran SD, Wang SM, et al. Evaluation of ASSURE(R) Dengue IgA Rapid Test using dengue-positive and dengue-negative samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;68(4):339-44.

206. Tan YY, Sekaran SD, Wang SM, Ahmed F, Hossain A, Sil BK. Development of ASSURE Dengue IgA Rapid Test for the Detection of Anti-dengue IgA from Dengue Infected Patients. *Journal of global infectious diseases*. 2011;3(3):233-40.

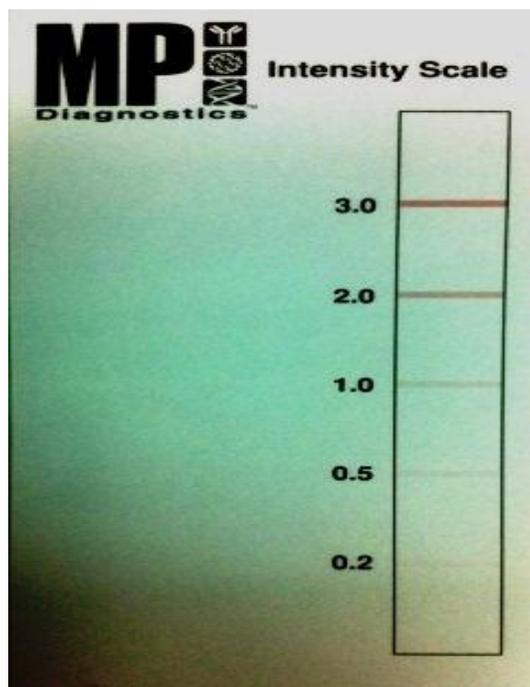
207. de la Cruz Hernandez SI, Gonzalez Mateos S, Flores Aguilar H, Lopez Martinez I, Alpuche Aranda C, Ludert JE, et al. Evaluation of a novel commercial rapid test for dengue diagnosis based on specific IgA detection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;72(2):150-5.
208. Naz A, Zahid D, Murky SN, Nadeem M, Sil BK, TS. S. Evaluation of efficacy of various immunochromatographic rapid tests for dengue diagnosis. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(1):166-71.
209. Guzman MG, Garcia G, Kouri G. [Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities]. *Pan American journal of public health*. 2006;19(3):204-15.
210. Belyakov IM, Hammond SA, Ahlers JD, Glenn GM, A. BJ. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):998-1007.
211. Jeurissen SHM, Claassen E, Van Rooijen N, Kraal G. Intra-intestinal priming leads to antigen-specific IgA memory cells in peripheral lymphoid organs. *Immunology*. 1985 56 417-23.
212. Eales L-J. Cells and tissues of the immune system. In: Eales L-J, editor. *Immunology for Life Scientists. SECOND EDITION* ed. University of Surrey, Guildford, UK.: John Wiley & Sons 2003. p. 18-24.
213. Abbas. *Regional Immunity: Specialized Immune Responses in Epithelial and Immune Privileged Tissues*. Abbas. 132011. p. 309.
214. Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005;12(10):1235-7.
215. Cuadrado E. *Inmunofisiología de la IgA*. Residencia Sanitaria Ntra Sra de Aranzazu, San Sebastian. 1982;1(4):141-9.
216. Nagura H, Smith P, Nakane P. IgA in human bile and liver. *Journal of immunological methods*. 1981;126:587-95.
217. Delacroix P, Dive C, Vaerman J. Simultaneous analysis of transport of monomeric and polymeric IgA between blood and bile in man. *Clinical science*. 1981;61:23-4.
218. Vazquez S, Lozano C, Perez AB, Castellanos Y, Ruiz D, Calzada N, et al. Dengue specific immunoglobulins M, A, and E in primary and secondary dengue 4 infected Salvadorian children. *Journal of medical virology*. 2014;86(9):1576-83.
219. Delgado I, Vasquez S, Bravo JR, Guzman MG. [Prediction of serotypes of dengue virus by response to IgM antibodies]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2002;54(2):113-7.

220. Guzman MG, Vazquez S, Kouri G. Dengue: where are we today? The Malaysian journal of medical sciences : MJMS. 2009;16(3):4-11.

*ANEXOS*

**ANEXOS**

**Anexo 1:**



**Escala de intensidades de bandas**

**(Sistema MPD-IgA).**

## Anexo2




**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**  
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Víricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



**INSTITUTO  
Pedro Kourí**

**COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 35-13**

**Fortalecimiento de las capacidades para el diagnóstico y la vigilancia virológica  
molecular en Cuba**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

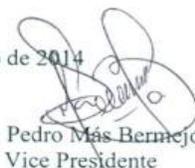
**Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTAMEN**

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dado, en el IPK, La Habana, a los 7 días del mes de Enero de 2014

<p> Dr. Eric Martínez Presidente</p>	<p> Dr. Pedro Más Bermejo Vice Presidente</p>
<p> Dra. María Caridad Montalvo Villalba</p>	<p> Dr. Roberto Fernández</p>

  
 Dra. Ana M. Montalvo  
 Teléfono (53 7) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (53 7) 202 0633; Fax (53 7) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK Y 51 2341 CUIPK  
 E-mail: ciiik@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13



## INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

### Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



#### CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kourí, 7 días del mes de Enero de 2014

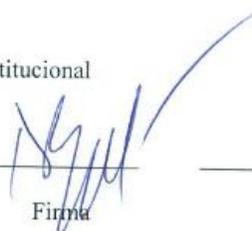
(lugar y fecha)

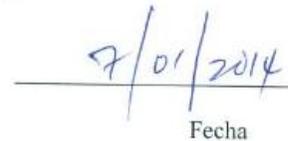
El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/institución
Dr. Eric Martínez (Presidente)	Médico	Invest. Titular/IPK
Dr. Pedro Más Bermejo (Vice Presidente)	Médico	Invest. Titular/ IPK
Dr. Roberto Fernández	Médico	Inv. Aux. /IPK
Dra. Ana Margarita Montalvo A.	Lic. Biología	Invest. Auxiliar/IPK
Dra. María C. Montalvo	Médico	Investigador Auxiliar/IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

Dr. Eric Martínez

  
Firma

  
Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

## Anexo 3:

CEIPK 12-08



**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
"PEDRO KOURÍ"**  
Ministerio de Salud Pública

**Centro Auspiciado por la UNESCO  
Centro Colaborador de la OMS/OPS**

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



**INSTITUTO  
Pedro Kourí**

*[Handwritten Signature]*

**COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

**PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

**"Estudio de casos de Dengue Hospital Salvador Allende"**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

**Lic. Rosa Ramirez Bartutis**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente proyecto de investigación por los integrantes de la Comisión de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

**DICTÁMEN**

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki V, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el proyecto aparece reflejado de forma clara la forma de protección de los derechos y beneficios de los sujetos participantes en la investigación.
3. Se aprueba el proyecto presentado

Dado, en el IPK, Ciudad de La Habana, a los 8 días del mes de agosto del año 2008.

<p><i>[Signature]</i> Dr. Eric Martínez Torres Presidente CEI-IPK</p>	<p><i>[Signature]</i> Lic. Iliana Valdés Hernández Secretaria</p>
<p><i>[Signature]</i> Dra. Maria Caridad Montalvo Villalba</p>	<p><i>[Signature]</i> Dra. Maria Margarita Ramirez</p>
<p><i>[Signature]</i> Lic. Caridad Planas Valdés</p>	

Teléfono (537) 202 0430 al 40 (pizarra) Teléfono (537) 202 0633; Fax: (537) 204 6051 Telex: 51 1902 CUIPK y 51 2341 CUIPK  
E-mail: ciipk@ipk.sld.cu, Dirección: Autopista Novia del Mediodía Km. 6 ½, Ciudad Habana, Cuba, P.O. Box: 601 Marianao 13



## INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

### Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias



### CERTIFICACIÓN DE SEGURIDAD

El que firma certifica que todas las actividades de investigación de esta solicitud, que involucra humanos, fueron examinados y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", que se reunió en:

La Habana, Instituto Pedro Kouri, 8 de agosto de 2008

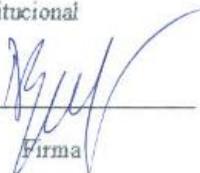
(lugar y fecha)

El Comité de Ética estuvo formado por los siguientes miembros:

Nombre y Apellidos	Profesión	Cargo actual/institución
Dr. Eric Martínez Torres (Presidente)	Médico	Invest. Titular/IPK
Lic. Iliana Valdés Hernández (Secretaria)	Lic. Microbiología	Invest. Agregado/IPK
Dra. María Caridad Montalvo Villalba	Médico	Investigador Auxiliar/IPK
Dra. María Margarita Ramírez	Médico	Investigador Auxiliar/IPK
Lic. Caridad Planas Valdés	Lic. Enfermería	IPK

Presidente del Comité de Ética Institucional

Dr. Eric Martínez Torres

  
Firma

  
Fecha

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

IPK 12-08  
10/Julio/08  
J.F.

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA  
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología, como órgano asesor científico-técnico de la Subdirección de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), ha revisado y aprobado la propuesta de Protocolo de Investigación titulada: Estudio clínico, virológico e inmunológico de los casos de dengue durante las epidemias que ocurran en la ciudad, desarrollado por los investigadores Dra. María G. Guzmán y colaboradores.

Teniendo en cuenta las situaciones epidemiológicas que ha enfrentado el país en los últimos años, el presente protocolo se propone establecer las bases para el estudio de casos clínicos de dengue en epidemias y estudiar diferentes aspectos virológicos y clínicos que caracterizan las mismas.

Los resultados que se esperan obtener aportarán nuevos conocimientos sobre el comportamiento del virus dengue en pacientes con un cuadro clínico agudo y sobre la progresión hacia la forma severa de la enfermedad, lo que a su vez permitirá, tanto desde el punto de vista clínico como virológico, una mejor comprensión y control de la enfermedad.



Dra Alina Llop Hernández  
Presidente  
Comisión Científica Especializada  
de Microbiología (CEM)  
IPK



Dr Carlos M. Fernández Andreu  
Secretario

La Habana, 27 de Junio de 2008

## PUBLICACIONES, EVENTOS Y TESIS

### Publicaciones relacionadas con la tesis:

- ❖ **Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue.**

MSc. José Johanatan Valdez Sandoval, MSc. **\*Didye Ruiz Amores**, Dra. C. Susana Vázquez Ramudo, Téc. Naifi Calzada Gutiérrez, Dra. C. María G. Guzmán tirado. **\*Autor correspondiente. *Rev Cubana Med Trop* 2012; 64(1):27-34.**

- ❖ **Immunoglobulin A Antibody Responses in Patients with Primary or Secondary Dengue Infections.**

**Didye Ruiz\***, Susana Vázquez, Hernán C. Ríos, Naifi Calzada, María G. Guzmán. *Open Access Library Journal*. 2016; 3: e3212.

### Publicaciones relacionadas con el tema de investigación:

- ❖ **Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients.**

Susana Vázquez, **Didye Ruiz**, Rafael Barrero, Rosa Ramírez, Naifi Calzada, Blanca del Rosario Peña, Silvia Reyes, María Guadalupe Guzmán. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 68 (2010) 46–49.

- ❖ **Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA.**

María G. Guzmán\*, Thomas Jaenisch, Roger Gaczkowski, Vo Thi Ty Hang, Shamala Devi Sekaran, Axel Kroeger, Susana Vázquez, **Didye Ruiz**, Eric Martinez, Juan C. Mercado, Angel Balmaseda, Eva Harris, Efren Dimano, Prisca Susan A. Leano, Sutee

Yoksan, Elci Villegas, Herminia Benduzu, Iris Villalobos, Jeremy Farrar, Cameron P. Simmons. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010; 4(8).

- ❖ **Dengue specific immunoglobulins M, A, and E in primary and secondary dengue 4 infected Salvadorian children.**

Vázquez S, Lozano C, Pérez AB, Castellanos Y, **Ruiz D**, Calzada N, Guzmán MG. *Journal Medical Virology*. DOI 10.1002/jmv. 2014.

- ❖ **Virological and Serological markers in dengue patients from Venezuela and Nicaragua.**

**Didye Ruiz \***, Susana Vázquez, Elci Villegas, Angel Balmaseda, Maritza Pupo, Mayling Álvarez, Delfina Rosario, Herminia Bendezu, Naifi Calzada and María G Guzmán. *Open Access Library Journal*. 2017; 4: e3309.

#### EVENTOS:

- ❖ **BTJ departamental.**

10 de diciembre 2012, IPK, Póster titulado: Evaluación de un sistema comercial para la detección rápida de anticuerpos IgA a virus dengue. Autor Principal:

- ❖ **3ra Reunión de la Red Panamericana de Investigaciones de Dengue.**

Del 12 al 15 de septiembre. 2013. Colombia Póster: Kinetic of dengue virus NS1 protein in dengue confirmed adult patients. Autor Principal:

- ❖ **Curso Internacional de Epidemiología Molecular.**

Del 26 julio al 2 agosto 2013, Fiocruz, Salvador-Bahía, Brasil. Póster: **Kinetic of dengue virus NS1 protein in dengue confirmed adult patients**. Autor Principal:

- ❖ **2do Encuentro Nacional sobre enfermedades olvidadas y XIV Simposio Internacional sobre control epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores.**

Del 20 al 21 Octubre 2011. Buenos Aires Argentina. Póster: Cinética de la proteína NS1 en pacientes confirmados de dengue. Autor.

**TESIS:**

- ❖ Tesis de Maestría: **“Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de NS1/IgM/IgG”**, José Johanatan Valdez Sandoval. Agosto 2010.
- ❖ Tesis de Maestría: **Respuesta de anticuerpos IgA en pacientes con infección primaria y secundaria a virus dengue 3**. Dr. Hernán César Ríos Escalier. Junio 2011.
- ❖ **Trabajo Metodológico Final: Diagnóstico serológico del dengue mediante la detección de anticuerpos IgM e IgG**. Sept-Dic 2011. Alumno Yasmany Deusted Valle del Politécnico de Química “Mártires de Girón” Informe del trabajo.
- ❖ Tesis de Diploma: **“Evaluación de un sistema rápido de detección de anticuerpos IgA a virus dengue”**, alumno Ricardo Ulises Martínez, Facultad de Biología de la Especialidad de Microbiología, junio-2012.
- ❖ **Trabajo Metodológico Final: Respuesta de anticuerpos IgG a virus dengue**. Alumno Ariel Ruano Curbelo del Tecnológico de Química “Mártires de Girón”. Dic/2012