

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y SEROLÓGICA DE LAS INFECCIONES
POR EL VIRUS DEL DENGUE EN LA CIUDAD DE BARRANQUILLA Y ÁREA
METROPOLITANA DURANTE LOS AÑOS 2006 - 2007**

NAPOLEÓN DE LA OSSA MERLANO, MD

**Tesis de Post-grado presentada como requisito para optar el título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas
Énfasis: Enfermedades Tropicales**

SUPERVISOR: ANDREW K.I. FALCONAR, PhD

**GRUPO DE INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA – COLOMBIA
2012**

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y SEROLÓGICA DE LAS INFECCIONES
POR EL VIRUS DEL DENGUE EN LA CIUDAD DE BARRANQUILLA Y ÁREA
METROPOLITANA DURANTE LOS AÑOS 2006 - 2007**

NAPOLEÓN DE LA OSSA MERLANO, MD

**Tesis de Post-grado presentada como requisito para optar el título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas
Énfasis: Enfermedades Tropicales**

SUPERVISOR: ANDREW K.I. FALCONAR, PhD

**GRUPO DE INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES TROPICALES
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA – COLOMBIA
2012**

A mis padres, mi hermano y tía Nancy.

A mis amigos.

Recordarás algo de lo que leas, bastante de lo que oigas,
mucho de lo que veas y todo lo que hagas.

John Little B.

AGRADECIMIENTOS

- A los doctores Andrew Falconar y Claudia Romero-Vivas por sus consejos, enseñanzas, apoyo ético e intelectual.
- A la doctora Iris Villalobos de Chacón, por sus enseñanzas y hospitalidad durante el entrenamiento clínico en la ciudad de Maracay.
- A la doctora Elsa de Plata y el equipo de vigilancia epidemiológica por su compromiso con el proyecto y la comunidad.
- Al personal directivo y asistencial del Hospital Pediátrico de Barranquilla, Hospital Universidad del Norte y Secretaría Distrital de Salud Pública, por haber permitido la logística planteada.
- A las doctoras Lila Visbal, Natalia Ruiz, corte de internos y residentes (2006-2007) del Hospital Universidad del Norte y residentes, por su interés y apoyo en el proyecto.
- A Rosmery, Yimmi, Sofía y Luis Eduardo, por hacer que todo fuera mas sencillo.

- La maestría y este trabajo se pudo desarrollar gracias al apoyo económico recibido a través del proyecto N° 504-2003 financiado por COLCIENCIAS al Dr Andrew Falconar.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Cincuenta millones de casos de dengue alrededor del mundo son reportados anualmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ilustrando el impacto de esta enfermedad. Barranquilla esta en riesgo de presentar epidemias de las formas más severas por la co-circulación de serotipos y localización geográfica.

OBJETIVO: Caracterizar clínica y serológicamente las infecciones por el virus del dengue en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana durante el periodo 2006 – 2007.

METODOLOGIA: Estudio prospectivo descriptivo. Se registraron aspectos socio-demográficos, clínicos y serológicos de pacientes sospechosos de Fiebre Dengue (FD) y Dengue Hemorrágico (DH). Se aplicaron los criterios de la OMS para la definición de casos. Estos fueron confirmados mediante ELISA de captura para IgM/IgG anti-dengue. Se analizaron radios de densidad óptica obtenidos en sueros pareados para determinar tipo de respuesta inmune y validar la escala propuesta por Falconar y cols. Se utilizó el programa Epi-Info 6,04 para tabulación y análisis estadístico.

RESULTADOS: 115 pacientes participaron en el estudio. La mayor ocurrencia de casos confirmados se encontró en el barrio Porfín (36,5 %) de Barranquilla. La población más afectada fueron los estudiantes menores de 13 años ($p < 0,05$). Se confirmaron los casos de FD en el 31,1 % (33/106) de casos sospechosos y en el 78,6 % (33/42) de probables. Los casos confirmados de DH tuvieron una ocurrencia de 5,2 % (6/115) en la población general. Se encontró asociación estadística entre las infecciones por dengue y un conteo leucocitario en fase aguda menor de 4000/mm³ ($p < 0,05$). La prueba de torniquete presentó mayor especificidad (69,4 %) que sensibilidad (48,7 %). Los radios de densidad óptica propuestos por Falconar obtuvieron la mayor correlación al clasificar el tipo de respuesta inmune con respecto a los parámetros de la OMS.

CONCLUSIÓN: Se ha mantenido una tendencia constante de casos confirmados. Las formas severas de DH presentaron baja ocurrencia durante el periodo 2006 – 2007. La prueba de torniquete como parámetro único predictor no es útil en casos de FD. Los radios de densidad óptica propuestos por Falconar aplicados a sueros de fase aguda determinan correctamente el tipo de respuesta inmune.

Palabras claves: Fiebre Dengue, Dengue Hemorrágico, prueba de torniquete, ELISA de captura, radios de densidad óptica.

ABSTRACT

BACKGROUND: Fifty million cases of dengue around the world are reported annually by the World Health Organization (WHO) illustrating the impact of the disease. Barranquilla is at risk of presenting outbreaks of the most severe forms of the disease because of serotypes co-circulation and geographical localization.

OBJECTIVE: To characterize clinically and serological the dengue virus infections in the city of Barranquilla and metropolitan area during 2006 – 2007.

METHODOLOGY: Prospective study. Socio-demographics, clinical and serological aspects of Dengue Fever (DF) and Hemorrhagic Dengue Fever (HDF) suspect cases were recorded. WHO criteria were applied to define cases. These were confirmed by capture ELISA IgM/IgG anti-dengue. Optical density ratios obtained in paired serum samples were analyzed to determine the type of immune response and validate the scale proposed by Falconar. The Epi-Info 6,04 software was used for tabulation and statistic analysis.

RESULTS: 115 patients participated in the study. The most occurrence of confirmed cases was found in the neighborhood Porfin (36,5 %) of Barranquilla.

The most affected population were < 13 years students ($p < 0,05$). DF cases were confirmed in 31,1 % (33/106) of suspect cases and 78,6 % (33/42) of probables. Confirmed cases of HDF had an occurrence of 5,2 % (6/115) in the general population. Statistical association was found between dengue infections and leukocytes count in acute phase less than 4000/mm³ ($p < 0,05$). Tourniquet test had more specificity (69,4 %) than sensitivity (48,7 %) in the evaluated population. Optical Density ratios proposed by Falconar had the highest correlation to classify the type of immune response according to WHO criteria's.

CONCLUSION:

A constant tendency of confirmed cases has been maintained. Severe forms of HDF presented low occurrence over the period 2006-2007. Tourniquete test is useless as the unique predictor parameter in DF cases. Optical density ratios proposed by Falconar applied to acute patient serums determine correctly the type of immune response.

Key words: Dengue Fever, Hemorrhagic Dengue Fever, tourniquet test, captured ELISA, optical density ratios.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO CONCEPTUAL	21
2.1 Marco histórico.....	21
2.2 Fiebre dengue y dengue hemorrágico en las Américas...25	
2.2.1 Factores constituyentes a la re-emergencia de las infecciones por dengue en las Américas	27
2.3 Fiebre dengue y dengue hemorrágico en Colombia	31
2.4 El virus	33
2.4.1 Composición estructural del virus del dengue	34
2.4.2 Proteínas estructurales	34
2.4.3 Proteínas no estructurales	35
2.5 El vector	38
2.6 Ciclo de transmisión	40
2.7 Determinantes del mosquito en el comportamiento epidémico del dengue	42
2.8 Inmutopatogénesis de las infecciones por dengue	43
2.8.1 Tipos de infección: patrones de respuesta inmune	44
2.8.2 Rol de anticuerpos no neutralizantes.....	46

2.9	Definiciones clínicas de fiebre dengue y dengue	
	hemorrágico	49
2.9.1	Fiebre dengue	51
2.9.2	Dengue hemorrágico	52
2.10	Métodos de diagnóstico confirmatorio para infecciones por el virus del dengue	58
2.10.1	Aislamiento viral	60
2.10.2	Diagnóstico molecular	60
2.10.3	Diagnóstico serológico	61
2.10.4	Radios de densidad óptica	66
2.11	Manejo de pacientes con FD y DH durante fase febril.....	67
2.12	Manejo de pacientes con FD y DH durante fase afebril.....	68
3.	OBJETIVOS	76
3.1	Objetivo general	76
3.2	Objetivos específicos	76
4.	METODOLOGÍA.....	78
4.1	Población de estudio	78
4.1.1	Población diana	78
4.1.2	Población accesible	78
4.1.3	Población elegible	78
4.2	Instrumento	79
4.3	Logística	79
4.3.1	Puntos de captación de pacientes	79

4.3.2 Socialización del proyecto	80
4.3.3 Consideraciones éticas	80
4.4 Clasificación de casos	81
4.4.1 Caso sospechosos de FD	81
4.4.2 Caso sospechoso de DH	82
4.4.3 Caso probable de FD	83
4.4.4 Caso probable de DH	83
4.5 Recolección de muestras	84
4.5.1 Manejo de muestras	86
4.6 Técnica de laboratorio.....	86
4.7 Evaluación de características clínicas	93
4.8 Evaluación de prueba de torniquete	94
4.9 Evaluación de radios de densidad óptica	94
4.10 Procesamiento de datos	95
5. RESULTADOS	96
5.1 Población de estudio	96
5.2 Tiempo de estudio	98
5.3 Aspecto socio-demográficos	99
5.3.1 Edad y sexo	99
5.3.2 Raza	99
5.3.3 Abastecimiento de agua	100
5.3.4 Ocupación del paciente	101
5.4 Clasificación de casos de FD y DH en sospechosos y probables.....	102
5.4.1 Casos sospechosos de FD.....	102

5.4.2 Casos probables de FD.....	103
5.4.3 Casos probables de DH.....	103
5.5 Confirmación de infecciones en pacientes sospechosos.....	107
5.5.1 Distribución y área de estudio en pacientes confirmados.....	109
5.5.2 Distribución de casos confirmados en el tiempo de recolección	111
5.5.3 Aspectos sociodemográficos en pacientes confirmados.....	111
5.6 Confirmación de diagnóstico clínico y caracterización de manifestaciones clínicas.....	112
5.6.1 Hospitalizaciones.....	116
5.7 Tipo de infección (respuesta inmune) y presentación clínica.....	118
5.8 Evaluación de la prueba de torniquete	121
5.9 Evaluación de radios de densidad óptica.....	122
6. DISCUSIÓN.....	125
6.1 Características socio-demográficas.....	125
6.2 Clasificación de casos en FD y DH.....	126
6.3 Confirmación de casos.....	129
6.4 Caracterización clínica de los casos confirmados de FD/DH.....	133
6.5 Tipo de infección y presentación clínica.....	136
6.6 Evaluación de la prueba de torniquete	140
6.7 Evaluación de radios de densidad óptica.....	142

7. CONCLUSIONES

7.1 Aspectos socio-demográficos.....	144
7.2 Clasificación de casos sospechosos en FD y DH.....	144
7.3 Determinación de infecciones	145
7.4 Caracterización de las manifestaciones clínicas en pacientes confirmados	145
7.5 Tipo de infección y presentación clínica.....	146
7.6 Evaluación de la prueba de torniquete	146
7.7 Radios de densidad óptica.....	147
8. BIBLIOGRAFÍA.....	148
9. ANEXOS.....	176

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por el virus del dengue continúan siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Cincuenta millones de casos anuales son reportados por la Organización Mundial de la salud a nivel mundial ilustrando el impacto de esta enfermedad (1).

En las Américas, el dengue ha re-emergido como la principal arbovirosis en zonas donde el *Aedes aegypti* había sido erradicado. La primera epidemia de Dengue Hemorrágico (DH) se presentó en Cuba en 1981 causada por la aparición de un serotipo diferente (DENV-2) proveniente de una cepa asiática, relacionando el DH con la aparición de nuevos serotipos. El 98 – 99 % de los casos reportados para la epidemia cubana de 1981 fueron infecciones secundarias (2,3). Este fenómeno ha sido estudiado en Colombia, en donde se ha reportado la asociación entre la abundancia relativa de serotipos de dengue y la presencia de DH (4).

1. Gibbons, RV & Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*. 2002; 324: 1563-1566

2. Guzman MG, Kouri G, Vazquez S, et al. DHF epidemics in Cuba, 1981 and 1997: some interesting observations. *Dengue Bulletin* 1999;23:39–43).

3. Christine V. F. Carrington, Jerome E. Foster, Oliver G. Pybus, Shannon N. Bennett, and Edward C. Holmes. Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. *Journal of virology*, Dec. 2005, p. 14680–14687. Vol. 79, No. 23

4. Ocazonez R, Gómez S, Cortés F. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Rev. Salud Pública*. 9 (2):262-274, 2007.

Venezuela experimentó una epidemia en 1990 de 10.000 casos de DH y 74 muertes. Más de la mitad de los pacientes se encontraban por debajo de los 15 años (5). Así mismo, reportes del Sur Este Asiático y Cuba describen una alta frecuencia de casos en niños (6,7).

En Colombia se ha registrado un acumulado de 681,245 casos de FD en el periodo 1978 hasta el año previo al inicio de este estudio (2005), con una incidencia mediana de 112 casos por 100,000 habitantes. Desde 1990 (año en el que se reportó el primer caso de DH) hasta el año 2005 se han registrado oficialmente en el país 904 muertes por DH, con un promedio anual de 53 muertes (8), sin embargo, estos datos corresponden a la definición que se tiene como casos probables (según protocolo de la OMS) y no confirmados de tal manera que podría presentarse un sub o sobre registro de casos para el país.

Barranquilla por ser el principal puerto fluvial y marítimo de la costa Atlántica, favorece a: 1. la movilización de personas, esto es, la presencia continua de nuevos susceptibles; 2. la probabilidad de introducción de nuevas cepas

5. CAREC Surveillance Report, Dengue in the Caribbean 1990; 16: No. 1.

6. Hayes CG, Manaloto CR, Gonzales A, Ranao CP. Dengue infections in the Philippines: Clinical and virological findings in 517 hospitalized patients. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 110-6.

7. Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever, dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 216-20

8. Padilla JC. Situación del Dengue en Colombia. Simposio Internacional de Fiebres Hemorrágicas, 2006, Barranquilla. Universidad del Norte.

virulentas o nuevos serotipos del virus y 3. la ocurrencia de hiper-endemicidad de los virus del dengue, como es el caso de la co-circulación de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 (9), los cuales constituyen factores de riesgo que pueden contribuir a la ocurrencia de epidemias de DH en la ciudad. Para cuando este fenómeno ocurra, se debe contar con un claro entendimiento de los parámetros necesarios para definir correctamente los casos de FD/DH y de herramientas diagnósticas adecuadas que permitan confirmar si un paciente está o no infectado con el virus del dengue y de esta forma proveer un manejo adecuado.

La OMS dispone de guías para la identificación de casos de FD/DH, las cuales fueron utilizadas de manera rigurosa en este estudio. Muchos médicos plantean que estas guías no son prácticas y, al no ser aplicadas como se indica, conlleva a la clasificación errónea de casos. Se han realizado estudios cuyos resultados indican que modificaciones a estos criterios aumentan la exactitud diagnóstica (10,11,12).

9. Falconar AKI, De Plata Elsa, Romero-Vivas C. 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. *Clin. Vaccine Immunol*, Sept. 2006, p. 1044-1051.

10. Setiati T *et al.* Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infectious Diseases* 2007, **7**:22

11. George R: Problems in diagnosis and classification of dengue virus infection. *Malys J Pathol* 1993, **15**:25-27

12. Harris E, Videz E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A: Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000, **63**:5-11

La prueba de torniquete también ha sido estudiada para modificaciones en su parte metodológica encontrando que el brazalete convencional obtiene un mayor número de petequias que el brazalete elástico. Una prueba de torniquete puede ser positiva tanto en pacientes con FD como en DH. Se ha encontrado también la presencia de un porcentaje reducido de pacientes con resultados positivos y no presencia de infección por dengue (13). Por otra parte, muchos niños con infecciones por dengue, en riesgo de presentar síndrome de choque (SCD) pueden presentar una prueba de torniquete negativa. Muchos pacientes en etapa de choque profundo presentan una prueba de torniquete negativa (14)

El estudio de la prueba de torniquete en pacientes con sospecha clínica de dengue en la ciudad de Barranquilla reflejaría la validez diagnóstica del método en una región donde las mayor ocurrencia de casos son atribuidos a FD.

13. Thanh CXT, Nhan NT, Wills B. *et al.* Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vie Nam. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. 7 No. 2 pp 125-132 February 2002.

14. Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. Geneva. Chapter 2. Clinic Diagnosis.

Uno de los métodos utilizados para confirmar las infecciones con el virus del dengue es la aplicación del Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzimas (ELISA) de captura para anticuerpos IgM/IgG en muestras pareadas de suero. (15) Esta prueba fue utilizada en este estudio, a la vez que se validaron los ratios de Densidad Óptica ajustados por Falconar y cols (16). Estos evitarían la recolección de una segunda muestra de suero para confirmación de la infección, ahorrando tiempo y recurso.

15. Bruce L. Innis. Antibody responses to dengue virus infection. Chapter 11. Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: CAB International.

16. Falconar AKI, De Plata Elsa, Romero-Vivas C. 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. *Clin. Vaccine Immunol*, Sept. 2006, p. 1044-1051.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 MARCO HISTORICO

El origen de la palabra dengue es desconocido. Se ha especulado mucho sobre registros históricos de epidemias de etiología viral caracterizadas por fiebre, dolor de cabeza, mialgia, hemorragia y eritema. El concepto infección por dengue con base en las manifestaciones clínicas registradas en documentos históricos puede ser malinterpretado y no confiable, puesto que otras enfermedades como la fiebre chikungunya e infecciones por alphavirus (también transmitida por *Aedes aegypti*) presentan sintomatología similar (17).

Algunos autores han sentado hipótesis en un origen africano y su distribución alrededor del mundo gracias al comercio de esclavos. Los chinos fueron los primeros en describir una enfermedad compatible con dengue en el año 992 D.C, publicada en la Enciclopedia China (17).

Las primeras epidemias atribuidas a dengue ocurrieron en El Cairo, Egipto y Batavia (Yakarta), Indonesia en 1779 (18). Al siguiente año (1780), una epidemia con características similares ocurrió en el puerto de Philadelphia, siendo hasta entonces una colonia británica en Norteamérica. Esta descripción fue la primera escrita en inglés y realizada por Benjamin Rush (19).

17. Innis BL. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Exotic Viral Infections.

18. Soler, J.F., Hall, M.W. and Hitchens, A.P. (1926) Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.*, **29**, 1-302.

19. Tsai F. T. Flavivirus. Volumen 2. Enfermedades Infecciosas, (142) Theodore F. Tsai

En las primeras décadas del siglo XX aparecieron brotes esporádicos en todo el mundo. En 1903 Graham demostró la transmisión de la infección del dengue llevada por el mosquito *Aedes aegypti* (20,21).

Mientras aislaba el virus en 1944, Sabín demostró la falla de dos cepas virales para la protección cruzada de los seres humanos, estableciendo por tanto la presencia de serotipos virales del dengue. Para 1956, Hammon había caracterizado dos serotipos más (22). Después de la segunda guerra mundial se inició una pandemia con transmisión intensificada de múltiples serotipos virales en el Sur Este Asiático. En esta región geográfica el dengue hemorrágico apareció por primera vez en los años cincuenta (22,23)

La gravedad del dengue a nivel mundial se ha incrementado mas del cuádruple en los últimos 30 años, convirtiéndose ahora en la enfermedad viral mas común transmitida por mosquitos. El Sur- Este Asiático y el Pacífico Occidental son las áreas mas seriamente afectadas, aunque ha habido un rápido incremento en las Américas: el dengue es endémico en todos los territorios mencionados, como también en el Este Mediterráneo y en regiones africanas (figura 1).

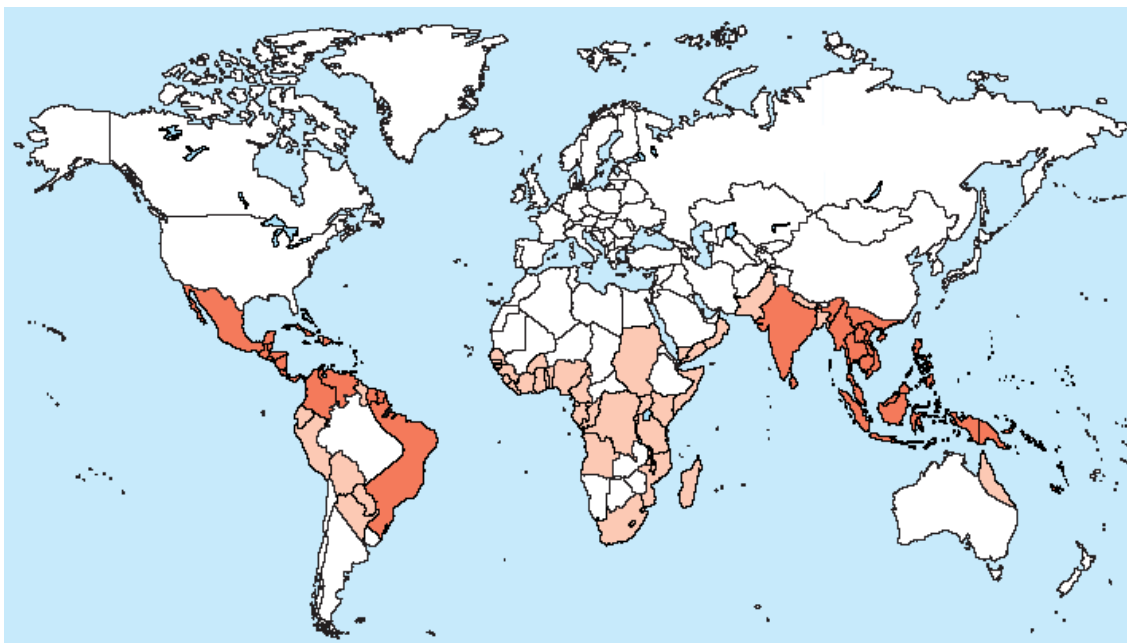
20. Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. J Trop Med 1903;6:209).

21. Ibid (21)

22. Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever. Do we know its cause? Am J Trop Med Hyg 1973;22(1):82-91.

23. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever. A public health problema and a field for research. Bull World Health Organ 1980;58(1):1-21

Figura 1. Distribución geográfica de dengue y dengue hemorrágico



Las áreas en rojo claro representan las regiones afectadas por fiebre dengue.

Las áreas en rojo oscuro representan las regiones afectadas por fiebre dengue y dengue hemorrágico.

Tomado de: Gibbons R, Vaughn D. Dengue: an escalating problem. Clinical Review. BMJ. 2002;324:1568-6

Junto con esta tendencia, ha habido una aparición de cepas más virulentas y una extensión geográfica de los vectores y la enfermedad alrededor de regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Se cree que esto se debe, al menos en parte, a los cambios demográficos mundiales, especialmente crecimiento descontrolado de la población, morbilidad, urbanización. Como resultado de esto, han ocurrido brotes con más frecuencia e intensidad, los cuales pueden desestabilizar sistemas de salud inapropiados (24).

La urbanización descontrolada conlleva al inadecuado manejo del agua y desperdicio de esta, promoviendo su almacenamiento en grandes contenedores y recipientes desechables no bio-degradables que se convierten

24. Implementation Research. Mobilizing research to halt exponential growth of dengue. TDR News. No 77. February 2007.

en hábitat para las larvas del mosquito (25).

Un factor importante que ha contribuido a la reemergencia de epidemias de dengue ha sido el debilitamiento en la infraestructura de los sistemas de salud en muchos países durante estos últimos 30 años. La falta de recursos ha conducido a la reducción crítica de especialistas entrenados que entiendan y puedan desarrollar programas efectivos de control para enfermedades transmitidas por vectores (26).

25. Gibbons R, Vaughn D. Dengue: an escalating problem. Clinical Review. BMJ. 2002;324:1568-6

26. Gubler D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clinical Microbiology Reviews. 1998. Vol. 11, No. 3. p. 480-496

2.2 FIEBRE DENGUE Y DENGUE HEMORRÁGICO EN LAS AMÉRICAS

En América se documenta la primera epidemia de dengue clásico confirmado en laboratorio en 1963 – 1964, afectando Venezuela y la cuenca del Caribe. Esta epidemia fue atribuida al serotipo 3. En 1968-1969 en varias islas del Caribe se aislaron los serotipos 2 y 3 (27).

En 1981 una epidemia de dengue hemorrágico en Cuba marcó el inicio de esta variante de infección por dengue en las Américas. Durante esta epidemia se reportaron 158 muertes, de los cuales 101 correspondían a menores de edad. El 98 – 99 % de los casos correspondieron a infecciones secundarias (28).

La segunda gran epidemia ocurrió en Venezuela desde Octubre de 1989 hasta Abril de 1990. Esta epidemia reapareció en la segunda mitad de 1993 y así sucesivamente hasta 1993, dejando 136 muertes durante este periodo. Los serotipos aislados fueron 1, 2 y 4 (29).

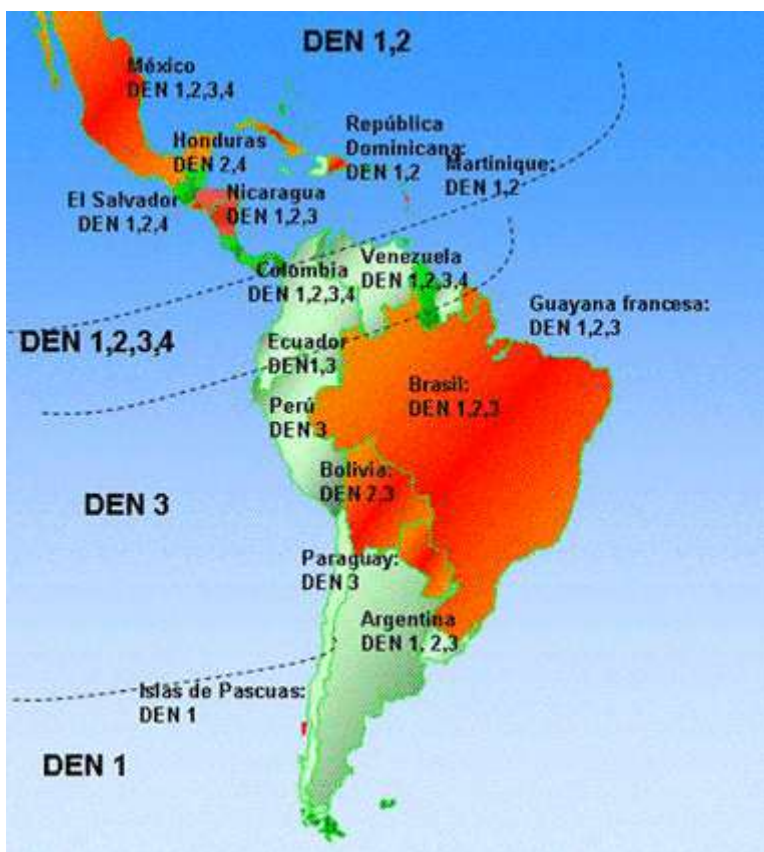
27. OPS/OMS. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica No. 548: Washington DC; 1995. P. 109

28. Guzman MG, Kouri G, Vazquez S, et al. DHF epidemics in Cuba, 1981 and 1997: some interesting observations. Dengue Bulletin 1999;23:39–43.

29. Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. 1997, Geneva. Chapter 1, Page 4.

En el período del 2001 al 2006 se notificaron 3.419.919 casos de dengue, incluidos 79.664 casos de dengue hemorrágico y 982 defunciones en las Américas, con una tasa de letalidad de 1.2% y la circulación de los cuatro serotipos, lo que aumenta el riesgo de aparición de las formas más graves de la enfermedad. (Figura 2) (30).

Figura 2. Serotipos circulantes durante 2006 – 2007 en Centro y Sur América

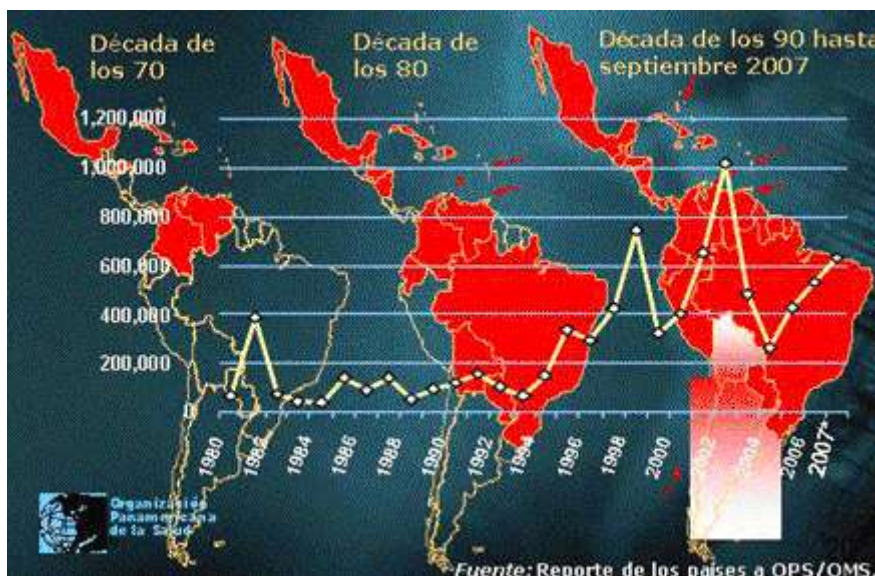


Fuente: OPS/OMS. Dengue en las Américas: Resumen 2007

30. OPS/OMS. Dengue en las Américas: Resumen 2007. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. Vol. 4, No. 9 (26 septiembre, 2007)

En los últimos 22 años, la incidencia de dengue en todas las subregiones de las Américas ha tenido una tendencia ascendente, con picos epidémicos cada vez mayores que se repiten cada 3–5 años casi de manera regular. (Figura 3)

Figura 3. Evolución de la situación histórica del dengue y dengue hemorrágico en las Américas, 1980 - 2007



Fuente: OPS/OMS. Dengue en las Américas: Resumen 2007. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. Vol. 4, No. 9 (26 septiembre, 2007).

2.2.1. Factores contribuyentes a la re-emergencia de las infecciones por dengue en las Américas

El *Aedes aegypti*, principal vector para el virus del dengue, se ha adaptado perfectamente al medio urbano. Este ha re-infestado prácticamente todas las regiones de las cuáles había sido eliminado (31).

31. Phillips ML. Dengue Reborn. Widespread resurgence of a resilient vector. Environmental Health Perspectives. Vol. 116, Number 9, September 2008

Los cambios epidemiológicos en las Américas han sido los más dramáticos. En los años 50's, 60's y en gran parte de los 70's, las epidemias por dengue al igual que los casos de dengue hemorrágico eran raros en las Américas porque el principal vector, *Aedes aegypti*, había sido erradicado (32). Estos programas de erradicación se discontinuaron a principio de los años 70's. Para los 90's, *Ae. aegypti* había ganado distribución geográfica en las regiones donde había desaparecido. (Figura 4)(33).

Figura 4. Infestación de *Ae. Aegypti* antes, durante y después de los esfuerzos concertados de erradicación en las Américas



Fuente: Arias JR. 2002. Dengue: how are we doing? Washington, DC: Pan American Health Organization. Implementation Research. Mobilizing research to halt exponential growth of dengue. TDR News. No 77. February 2007).

32. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. World Health Stat Q.1997; 50, 161-169).

33. Ibid (26)

Según reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dentro de los macrofactores mas importantes que inciden en el aumento de los casos se encuentra los fenómenos atribuibles al cambio climático (fenómeno del niño, la niña y el calentamiento global) que influyen en el comportamiento de las lluvias y huracanes o provocan intensas sequías que inciden en la expansión de organismos patógenos y vectores (34). El principal vector de áreas urbanas para el virus del dengue (*Aedes aegypti*) aumenta su tasa de productividad a mayor temperatura. El calentamiento global expandirá las zonas de productividad del vector, aumentando las zonas de riesgo para infecciones por el virus.

Otros macrofactores expuestos por la OPS señalan el crecimiento poblacional sin precedente en la población (urbanización no controlada ni planificada), con cinturones de pobreza y falta de servicios básicos especialmente los relacionados con el suministro de agua y las migraciones y los movimientos poblacionales que facilitan el movimiento de personas infestadas o enfermas a grandes distancias y en periodos de tiempo muy cortos, lo que contribuye a la dispersión del dengue entre los países (34). Esto es importante dado que la entrada de un serotipo nuevo o a la reaparición de uno ausente por largo tiempo, se han asociado con epidemias y aumento de dengue hemorrágico (35,36).

34. Ibid (30)

35. Ocazonez R, Cortés F, Villar LA, Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. Colombia Médica. Vol. 36 N° 2, 2005 (Abril-Junio).

36. Guzmán MG, Kourí G, Valdés G, Valdés L, Bravo J, Vásquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks.

La presencia de depósitos de agua, utilizados para contrarrestar los problemas de suministro constante del recurso, que al no tener una adecuada limpieza y protección se convierte en los principales focos de reproducción del *Aedes aegypti*, así como otros sitios de productividad del mosquito (37).

37. Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK. Pupa-productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* (L.) in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Apr;100 Suppl 1:S87-S95.

2.3 FIEBRE DENGUE Y DENGUE HEMORRÁGICO EN COLOMBIA

En Colombia, la migración de las poblaciones y el crecimiento desorganizado de las grandes ciudades con aumento de los cinturones de pobreza ha aumentado en los últimos años como consecuencia de los problemas de orden público en zonas rurales (38).

Los grupos de edad mas afectados por dengue en Colombia han sido aquellos entre 15 a 44 años (49 %) seguidos de los menores de 15 años (35 %) (39).

Después de la reinfestación por *Aedes aegypti*, en Colombia han ocurrido varias epidemias de dengue: en la costa Atlántica apareció el serotipo 2 en 1971; el serotipo 3 se transmitió principalmente en el interior del país en 1975; entre 1977 y 1978 el serotipo 1 circuló por el Valle de Rio Magdalena y otras zonas del interior del país; finalmente en 1986 apareció el dengue 4 (40).

En 1989 se diagnosticó el primer caso de dengue hemorrágico y la primera epidemia de este ocurrió en 1990, asociada a los serotipos 1 y 2. Se han registrado las mayores epidemias en los años 1998 y 2001. En 1998 se registraron 30 muertes por dengue hemorrágico (40).

38. Guía de Atención del Dengue. Servicio de Salud de Colombia, 2000. En <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>

39. Simposio Internacional de Fiebres Hemorrágicas. Situación del Dengue en Colombia. Julio Cesar Padilla.

40. Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986; 6: 101-102.

En cuatro municipios del departamento de Santander se encontró asociación entre la abundancia relativa de serotipos del virus, cambios en el patrón de infección y la frecuencia de dengue hemorrágico. En esta región se identificaron los cuatro serotipos, pero la abundancia de estos han variado con el tiempo (DENV-1: 1998 – 1999; DENV-2: 1998 – 2001; DENV-3: 2001-2004); DENV-4: 2000-2001-2004). Cambios temporales de la frecuencia de DH coincidieron con cambios de predominancia de serotipos y frecuencia de infecciones secundarias (41)

En el año 2000 Barranquilla contaba con tres serotipos de Dengue (DENV-1, DENV-2 y DENV-4). La presentación clínica de estas infecciones correspondió a casos de FD. Un pico epidémico de infecciones por dengue puede contribuir a la aparición de DH en nuestra región dada la alta probabilidad de infecciones secundarias por co-circulación de serotipos (42).

Hasta el mes de septiembre de 2007, Colombia era el segundo país que mas casos de dengue y dengue hemorrágico reportaba para Sur América. Durante el periodo 2006 – 2007 circularon para Colombia los cuatro serotipos del virus del dengue (43).

41. Ocazonez R, Gómez S, Cortés F. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Rev. Salud Pública.* 9 (2):262-274, 2007

42. Falconar AKI, De Plata Elsa, Romero-Vivas C. 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. *Clin. Vaccine Immunol*, Sept. 2006, p. 1044-1051.

2.4 EL VIRUS

Existen cuatro serotipos del virus del dengue, llamados DENV-1, DENV-2, DENV-3, y DENV-4. Estos pertenecen al género *Flavivirus*, familia Flaviviridae, el cual contiene aproximadamente 70 virus. Gran número de ellos son patógenos al hombre, por lo que son causantes de problemas en salud pública. Las características patógenas de los flavivirus están determinadas por la vía de entrada en el huésped, la concentración del virus dentro del paciente, el tropismo tisular específico del virus individual y la evolución de la infección (44).

Los flavivirus son relativamente pequeños (40-50 nm) y esféricos, con envoltura lipídica. Esta es de 10 nm de espesor y contiene dos proteínas que dan lugar a proyecciones localizadas en la superficie del virión de aproximadamente 7 nm de longitud (45). Esta bicapa se deriva de la membrana celular del hospedero. La nucleocápside icosaédrica contiene una molécula de ARN de cadena simple, con orientación positiva. Su peso es de 42 kD (46). El genoma de los flavivirus es de aproximadamente 11,000 bases de longitud.

44. Murray P., Kobayashi G., Pfaller M., Rosenthal K. Microbiología médica. Segunda edición. Cap. 63, pag 651.

45. Condit RC. Principles of Virology. In: Howley PM, editor. Fields Virology. Fourth Edition ed. London-New York – Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001)

46. Rice CM. Overview of flaviviruses molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. South East Asian J Trop Med Public Health 1990;21(4):670-7)

2.4.1 Composición estructural del virus del dengue

El virión maduro tiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside, la proteína M asociada a la membrana y la proteína E de la envoltura. Las proteínas no estructurales se denominan: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, para las cuáles (estructurales y no estructurales) codifican el genoma del virus. El ARN genómico funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación (47,48).

2.4.2 Proteínas estructurales

La proteína C es el principal componente de la nucleocápside. Es rica en residuos de arginina y lisina por lo que le confiere un carácter básico que le permite la interacción con el ARN viral.

La PrM es el precursor glicosilado de la proteína estructural M. La formación de la proteína M a partir de la PrM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica un incremento en la infectividad y la reorganización de la estructura de la superficie viral (47).

47. Henchal EA, Putnak JR. The Dengue viruses. Clin Microbiol Rev 1990; 3:376-96.

48. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999; 73:4738-47).

La glicoproteína E forma parte de la envoltura viral. Esta muestra propiedades biológicas muy importantes como la inducción de anticuerpos neutralizantes, fusión de las membranas endosómicas, exposición de sitios que median la hemaglutinación (inmunoamplificadores e inhibidores), enlace al receptor celular y fusión de membrana catalizada por ácidos, necesaria para la infección (49,50). Constituye la principal proteína estructural de los flavivirus y la más conservada de éste género.

2.4.3 Proteínas no estructurales

La proteína no estructural -1 (NS1) se relaciona con la respuesta inmune específica de serotipo (51). Está expresada en la superficie de las células infectadas y además es excretada como antígeno fijador del complemento. Se ha planteado que esta proteína posee un papel en la replicación temprana. Mutaciones de esta partícula afectan la virulencia de la partícula viral (52).

49. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades Infecciosas, principios y práctica. Vol. 2. Edit. Panamericana. Cap. 142. Pag. 2092

50. Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflects modifications of viral structure. *Virology* 1993;196(1):209-19

51. Seijo A. Dengue grave: generalidades e inmunopatogenia. En: Dengue grave. Asociación de Alergia, Asma e Inmunología "Buenos Aires". Junio 1999.

52. Pletnev AG, Pletnev AG, Bray M, Lai CJ. Chimeric tickborne encephalitis and Dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 1993; 67:4956-63.

Además de sus funciones de replicación, NS1, NS2a, NS3 y NS5 exhiben epítopes que median la respuesta linfocíticas del serotipo viral y cruzadas de los flavivirus, restringidas por el HLA (53).

La NS2 está constituida por dos proteínas (NS2A y NS2B). Puede encontrarse atravesando la membrana y además ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN (54).

La NS3 es la segunda proteína en tamaño del virus y es altamente conservada entre los *Flavivirus*. Se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de la replicación viral. Esta proteína se asocia a la membrana a través de su interacción con la NS2B (55).

La NS4 da origen a la NS4A y NS4B. Esta proteína participa en la replicación del ARN, considerando su interacción con la NS1 (54).

53. Mathew A, Kurane I, Green S, et al. Predominance of HLA- restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotypecross-reactive epitopes on non structural proteins following natural secondary dengue virus infection. J Virol. 1998;72:3999

54. Ibid (45)

55. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. J Virol Methods 2003;114(1):45-54

La NS5 es una proteína mas conservadas. Es una proteína básica y se cree que funciona como una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cuál es inhibida por anticuerpos anti-NS5 en mas del 99 % (56).

56. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant Dengue Type virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* 1996;216:317-25

2.5 EL VECTOR

El virus del dengue es transmitido a los humanos mediante la picadura de la hembra del mosquito *Aedes aegypti*. Este es el vector epidémico más común en el mundo. Se alimenta primordialmente durante el día y pica principalmente durante la mañana o en las últimas horas de la tarde en áreas cubiertas (57). (Figura 5).

Figura 5. Mosquito *Aedes aegypti*



Tomado de: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide07.htm>

Se conocen además otras variedades de *Aedes*: *Ae. aegypti* var. *Formosus* y *Ae. aegypti* var. *queenslandensis*). *Ae. albopictus*, *Ae. polyniensis* y otras

57. Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1997

especies del complejo *Ae. scutellaris* han sido incriminados como responsables de epidemias (58). *Aedes albopictus* es ocasionalmente un vector importante en áreas rurales y sub-urbanas en el Sur Este Asiático y estuvo incriminado en una epidemia en Hawaii (2001) con 122 casos confirmados en la isla de Maui (59).

A. aegypti tiene una distribución muy amplia y estable entre los trópicos y zonas subtropicales; tiene, además, una preferencia doméstica en su ciclo de vida, por lo que su adaptabilidad es muy grande hacia los diferentes escenarios que el hombre hace en sus viviendas; muy difundido en áreas con características urbanas, aunque también se encuentra en áreas rurales.

Se distribuye en forma permanente entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur, donde coinciden con una soterminia de 10 °C en verano, la altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1,200 metros, aunque se ha registrado alturas de alrededor de los 2,400 metros sobre el nivel del mar en África (60).

En América la mayor altitud registrada corresponde a Colombia, con 2,200 metros (61).

58. Gubler, D. J. 1988. Dengue, p. 223–260. In T. P. Monath (ed.), Epidemiology of arthropod-borne viral diseases. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla

59. Effler P.V., Pang L., Kitsutani P., Vorndam V. et al. Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. Emerging Infectious Diseases. Vol. 11, No. 5, May 2005. www.cdc.gov/eid

60. Secretaría de Salud. Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue. Estados Unidos de México. Cap- 3, pag. 16-21

61. Suarez, M. F., and M. J. Nelson, M. J. 1981. Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. Biomédica (Bogotá) 1:225

Estos mosquitos tienen dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: una fase acuática o de estadios inmaduros, la cuál posee tres formas evolutivas (huevo, larva y pupa) y una fase aérea o de adulto, que corresponde al mosquito (62).

El periodo acuático tiene una duración promedio de 10 días, pero puede prolongarse a más del doble de tiempo, cuando la temperatura disminuye o los alimentos son escasos, o reducirse hasta cinco días cuando hay alimento y la temperatura oscila entre los 24 y 34 ° C (62).

Las larvas y pupas de *A. aegypti* prefieren el agua limpia en muchos tipos diferentes de contenedores artificiales. Los huevos pueden resistir la disecación por meses y eclosionar cuando se sumergen en agua (63).

2.6 CICLO DE TRANSMISION

Los mosquitos se infectan con el virus del dengue cuando se alimentan de sangre humana de un paciente en periodo de viremia. Las hembras de los mosquitos necesitan alimentarse de sangre para lograr la maduración de sus huevecillos (62).

62. Ibid (60)

63. Halstead SB. Dengue-virus mosquito interactions. Annu. Rev. Entomol. 2008. 53:273–91 Annu. Rev. Entomol. 2008.53:273-291

El mosquito al ingerir sangre permanece infectado durante toda la vida (64). Si este ingiere suficiente carga viral, el virus infectará las células epiteliales del intestino medio del mosquito y se diseminará desde el intestino hacia sitios secundarios de replicación que incluyen hemocitos, cerebro y otros tejidos nerviosos y glándulas salivales.

El virus se desarrolla en el mosquito por un periodo de 8 a 10 días antes de que pueda ser transmitido a otros humanos (Periodo de Incubación Extrínseco) en una próxima ingesta de sangre. El Periodo de Incubación Extrínseco depende en parte de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura ambiente. Finalmente, el dengue es secretado al lumen de las glándulas salivales y puede ser transmitido a otro humano en la próxima ingesta de sangre (65,66).

Las hembras mosquitos infectadas pueden pasar el virus a la siguiente generación mediante transmisión transovárica, pero esto no ocurre frecuentemente y probablemente no contribuye significativamente a la transmisión en humanos (64).

64. Siler JF, Hall MW, Hit6 AP. 1926. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philipp. J. Sci.* 29:1–304

65. Black, W.C., IV, K. E. Bennett, N. Gorrochotegui-Escalante, C.V. Barillas-Mury, I. Fernandez-Salsa, M. de Lourdes Muñoz, J.A. Farfan-Ale, K.E. Olson, and B.J. Beaty. 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* 33:379-388.

66. Sriurairatna, S., and N. Bhamarapavati. 1977. Replication of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* mosquitoes. An electron microscopic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:1199-1205.

2.7 DETERMINANTES DEL MOSQUITO EN EL COMPORTAMIENTO EPIDÉMICO DEL DENGUE

El estatus biológico y el tamaño poblacional del vector son críticos en la dinámica de transmisión del virus del dengue. Los requerimientos de densidad para transmisión, el número básico de reproducción (número de infecciones secundarias que resultan de un único humano infectado), la heterogeneidad espacial de los criaderos de *A. aegypti*, efecto de la temperatura y las precipitaciones contribuyen importantemente a la infección del mosquito por el virus del dengue (67).

67. Ibid (60).

2.8 INMUNOPATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES POR DENGUE

El virus del dengue causa enfermedad mediante dos mecanismos. En el primero, los virus infectan y pueden matar células en los órganos blancos. La destrucción de órganos mediante este efecto citopático puede causar mal funcionamiento y conducir a enfermedad. Un segundo mecanismo para el desarrollo de la enfermedad consiste en la destrucción o malfuncionamiento de órganos causada por la respuesta inmune contra el virus (autoinmunidad), mas que por el efecto citopático *per se* (68).

Estudios patológicos realizados en tejidos comprometidos han mostrado que el daño de estos no es tan grave en relación a la severidad de la enfermedad. Estas observaciones sugieren que la fuga capilar, principal característica del DH, puede ser debida a una alteración en la permeabilidad vascular más que a destrucción estructural de células endoteliales. La patogénesis del DH no esta bien definida, sin embargo, existen registros que documentan fuertemente los mecanismos inmunopatológicos como causantes de muchos casos de DH. (68,69). También se atribuye la severidad de la enfermedad a la existencia de cepas más virulentas (70).

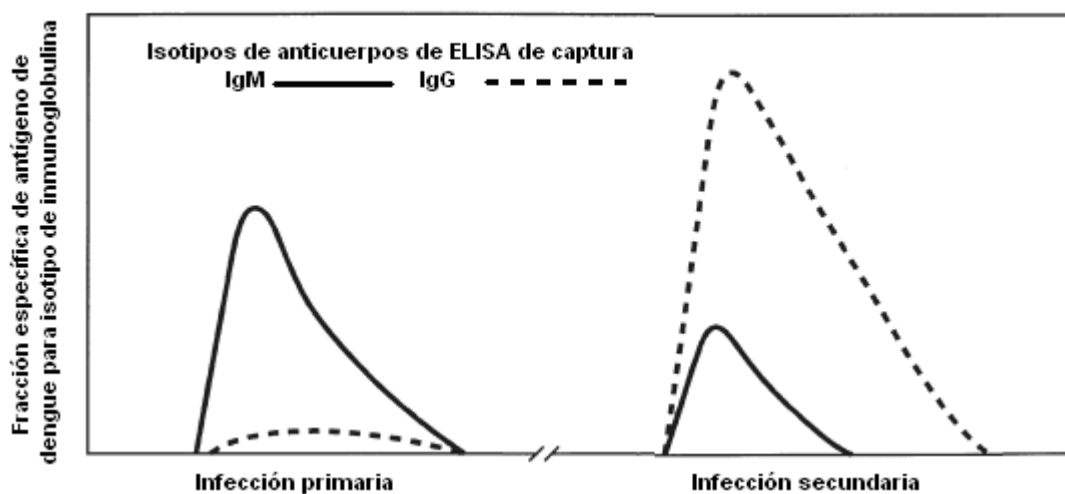
68. Kurane I, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Oxon, UK: CBA International; 1997. p. 273–90

69. Bhamarapravati, N. (1989) Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*. (Suppl. 4), S826-S829).

2.8.1 Tipos de infección: Patrones de respuesta inmune

Se distinguen dos patrones de respuesta inmune: primario y secundario (respuesta anamnésica). (Figura 6).

Figura 6. Tipos de respuesta inmune en una infección por dengue



Tomado de: Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. Geneva. Chapter 4, Page 35.

Las personas que nunca han sido infectadas por flavivirus o inmunizadas con vacunas contra flavivirus (por ejemplo, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas), montan una respuesta primaria de anticuerpos cuando son infectadas por estos virus. La inmunoglobulina dominante en este caso es la IgM. Una vez detectables, los niveles de IgM se elevan rápidamente y tienen un pico dos semanas después de haber iniciado la infección, aproximadamente. En una serie de pacientes, el 80 % tenían niveles detectables de anticuerpos IgM para el día 5 y el 99 % de pacientes los tenía

para el día 10. Luego caen a niveles indetectables en un periodo de 2 a 3 meses.

La definición fisiológica de una infección primaria es aquella caracterizada por una alta fracción molar de anticuerpos IgM anti-dengue y una fracción molar baja de anticuerpos IgG anti-dengue (71).

Los individuos con inmunidad previa debida a una infección por flavivirus desarrollan una respuesta de anticuerpos secundaria (anamnésica) al infectarse con el virus del dengue. En las infecciones secundarias, en las cuáles se desarrolla en la mayoría de los casos DH, el isotipo de inmunoglobulina dominante es la IgG. Los niveles de IgM pueden aparecer, pero estos son mucho más bajos que los niveles de IgG. En contraste con las infecciones primarias, en las infecciones secundarias por virus del dengue se encuentran niveles altos de IgG anti dengue antes o simultaneamente a la respuesta por IgM. Una vez detectable la IgG, esta alcanza un pico en dos semanas y declina lentamente en un periodo de 3 a 6 meses. La definición fisiológica para una infección secundaria es aquella caracterizada por baja fracción molar de IgM anti dengue y alta fracción molar de IgG que es ampliamente reactiva contra flavivirus; tanto la IgM como la IgG anti dengue tienen la capacidad de neutralizar el virus (71)

2.8.2 Rol de anticuerpos no neutralizantes

Las infecciones por un serotipo confieren inmunidad protectora para el serotipo infectante, pero no para los otros. Cuando se es infectado por segunda vez (infección secundaria) por un serotipo diferente, puede ocurrir las formas severas de las infecciones por dengue (72).

La respuesta inmune en el huésped incluye anticuerpos de reacción cruzada para el virus del dengue, que aumentan la infección. Los anticuerpos de reacción cruzada que fallan en la actividad neutralizante son inducidos en la infección primaria. En una infección secundaria por un serotipo diferente, el virus del dengue y la forma no neutralizante del anticuerpo forman un complejo virus-anticuerpo que se une a los receptores de las células blanco y resulta en aumento de la infección por el virus. Este fenómeno es conocido como captación dependiente de anticuerpo (Antibody – dependent Enhancement - ADE). El virus del dengue infecta monocitos ya sea mediante entrada directa, o por medio del fenómeno descrito (ADE) (71).

Los monocitos infectados por dengue activan las células T. Ambas células producen citoquinas y otros mediadores químicos (TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IFN γ) estimulantes del endotelio que provocan fuga capilar en los casos severos de dengue (73).

72. Halstead, SB (1988). Pathogenesis of dengue. Challenges to molecular biology. *Science* 238, 476-481.

73. Rothman AL. Immunology and Immunopathogenesis of Dengue Diseases. *Advances in virus research*, 2003, Vol. 60, p397-419.

Esta teoría es cimentada por los siguientes hallazgos (74,75,76):

- Estudios de cohorte prospectivos y epidemias de dengue en islas han mostrado que mucho de los casos de DH/SCD ocurren en infecciones secundarias.
- DH/SCD ocurre en niños menores de un año de edad, durante su primera infección por dengue, requiriendo como factor de riesgo necesario anticuerpos maternos circulantes para dengue.
- *In vitro*, los anticuerpos IgG para dengue no neutralizantes pueden unirse al virus y unirse al receptor Fc e incrementar la infección viral por dengue en líneas celulares de macrófagos o monocitos de sangre periférica.
- Se ha documentado aumento de viremias *in vivo* en modelos animales de monos rhesus durante infecciones secundarias por DENV-2.
- En los humanos el aumento de las viremias se correlacionan con la severidad de la enfermedad.

74. Halstead SB. ADE (Antibody dependent Enhancement. Host response to dengue infection. In: *Dengue digest*. Vol 2, No. 2, July 2005

75. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370:1644-52

76. Innis, B. L. 1995. Dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 103–146. In J. S. Porterfield (ed.), *Exotic viral infections—1995*. Chapman & Hall, London, United Kingdom

Se ha sugerido la posibilidad de un mecanismo que explique la trombocitopenia y la permeabilidad vascular. Los pacientes con dengue tienen anticuerpos IgM anti-plaquetas, como también anticuerpos IgM e IgG anti-células endoteliales posterior infección por dengue. Estos auto-anticuerpos anti-plaquetas, anti-células endoteliales presentan reacción cruzada con antígenos del dengue como la proteína NS1 o la prM. La proteína NS1 genera anticuerpos que presentan reacción cruzada con ciertas proteínas de la cascada de coagulación. La unión a anticuerpos anti - NS1 resultará en lisis de plaquetas mediada por complemento, o como un disparador de señales intracelulares en células endoteliales no infectadas que conducen a la producción de óxido nítrico y apoptosis. Esta teoría se introdujo dadas las manifestaciones clínicas provocadas por la trombocitopenia y la disfunción celular endotelial. Tanto el daño endotelial como la destrucción plaquetaria contribuyen a la hemorragia y el desbalance entre la coagulación y la activación de la fibrinólisis incrementaría la probabilidad de hemorragias en el DH/SCD (77,78,79).

77. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 2006 Summer;19(2):127-32. Review.

78. 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. *Arch Virol* 1997; 142: 897–916

79. Lin YS, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr Pharm Des.* 2004;10(2):213-21. Review

2.9 DEFINICIONES CLÍNICAS DE FIEBRE DENGUE Y DENGUE

HEMORRÁGICO

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por cualquiera de los cuatro serotipos del dengue. Posee un amplio espectro clínico de signos y síntomas caracterizándose en su forma mas leve por una fiebre indiferenciada que clínicamente es indistinguible de otras infecciones virales. En ocasiones, los pacientes pueden negar historia reciente de fiebre (80).

FD es la forma de infección por el virus diagnosticada mas frecuentemente y se caracteriza por inicio súbito de fiebre que demora de dos a siete días (fase aguda), acompañado de cefalea intensa, síntomas gastrointestinales, mialgias, artralgias y eritema. La forma clásica es autolimitada y usualmente resulta en recuperación completa. La fase convaleciente puede prolongarse por semanas y asociarse a debilidad y postración, usualmente en adultos (81,82).

La forma más severa de infección por dengue es el dengue hemorrágico (DH). Aunque representa una pequeña proporción de los pacientes infectados, es la única forma que ha sido definida por criterios estandarizados (83).

80. Wichmann O, Stark K, Shu P-Y, Niedrig M, Frank C, Huang JH and Jelinek T, Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:120.

81. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Review. Postgrad Med J 2004;80:588–601.

82. Ibid (29)

83. Ibid (58)

El DH se caracteriza en su estadio temprano por los signos y síntomas descritos para FD seguido por hemorragia y/o aumento en la permeabilidad vascular en sus últimos estadios. El aumento en la permeabilidad vascular puede conducir al colapso (síndrome de choque por dengue) y muerte.

Le enfermedad por dengue se muestra similar a otras enfermedades febriles, particularmente en las fases tempranas de la enfermedad. Por consiguiente, los diagnósticos son retrazados o confundidos con otras enfermedades, reduciendo la efectividad del diagnóstico clínico para el manejo del paciente y la vigilancia de la enfermedad (84).

Otras enfermedades infecciosas emergentes pueden dificultar el diagnóstico. En áreas donde no se identifique la leptospirosis como agente etiológico de fiebre sin foco aparente pueden hacerse diagnósticos erróneos de infecciones por dengue (85,86).

84. Tanner L., Schreiber M., Low GHJ, *et al.* Decision Tree Algorithms Predict the Diagnosis and Outcome of Dengue Fever in the Early Phase of Illness. Neglected Tropical Diseases. 2008, Vol. 2, Issue 3, e196

85. Libraty DH, Myint KSA, Murray CK, Gibbons RV, Mammen MP, et al. (2007) A Comparative Study of Leptospirosis and Dengue in Thai Children. *PLoS Negl Trop Dis* 1(3): e111.

86. Sanders, E. J., J. G. Rigau-Perez, H. L. Smits, C. C. Deseda, V. A. Vorndam, T. Aye, R. A. Spiegel, R. S. Weyant, and S. L. Bragg. 1999. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:399–404

2.9.1 FIEBRE DENGUE

Según la definición clínica de FD para la OMS, esta depende frecuentemente de la edad del paciente. Los infantes y escolares pueden tener una enfermedad febril indiferenciada, frecuentemente con eritema maculo-papular o pueden presentar diarrea, coriza, eritema y convulsiones, con menos incidencia de vómito, dolor de cabeza y dolor abdominal (87,88). Los niños más grandes y los adultos pueden tener tanto un síndrome febril leve o la clásica enfermedad incapacitante con fiebre alta de inicio súbito, algunas veces bifásica, cefalea intensa, dolor retro-ocular, mialgia, artralgia, náusea, vómito y eritema. Dentro de los hallazgos de laboratorio se puede observar enzimas hepáticas elevadas y disminución en el conteo plaquetario. También se puede encontrar leucopenia con neutropenia seguida de linfocitosis, marcada frecuentemente por la presencia de linfocitos atípicos (87, 90).

Las manifestaciones hemorrágicas en FD son infrecuentes, pero se han reportado hallazgos con petequia/púrpura, sangrado gastrointestinal, epistaxis y sangrado por encías (89, 90,91). Es importante diferenciar entre los casos de FD con sangrado inusual y los casos de DH con incremento en la permeabilidad vascular (87).

87. *Ibid* (57)

88. Pancharoen C, Mekmullica J, Thisyakorn U. Primary dengue infection: what are the clinical distinctions from secondary infection? *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:476–80

89. Ahmed FU, Mahmood CB, Sharma JD, et al. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in children the 2000 outbreak in Chittatong, Bangladesh. *Dengue Bulletin* 2001;25:33–9

90. Narayanan M, Aravind MA, Thilothammal N, et al. Dengue fever epidemic in Chennai—a study of clinical profile and outcome. *Indian Pediatr* 2002;39:1027–33

91. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Review. *Postgrad Med J* 2004;80:588–601.

La OMS propone las siguientes definiciones operativas para casos de FD:

Caso probable:

- Enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas:

Dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgia, artralgia, eritema, manifestaciones hemorrágicas, leucopenia y títulos en una serología de soporte (título recíproco ≥ 1280 en una prueba de inhibición-hemaglutinación, una ELISA IgG comparable) o una prueba positiva para anticuerpos IgM en un espécimen de suero en fase aguda tardía o en fase convaleciente.

u,

- Ocurrencia en el mismo lugar y tiempo de casos confirmados de FD.

Caso confirmado:

- Caso confirmado por criterios de laboratorio mediante la detección específica del virus, antígenos virales, secuencia genómica y/o detección de anticuerpos en muestras pareadas de suero.

2.9.2 DENGUE HEMORRÁGICO

La OMS requiere para definición de DH el cumplimiento de todos los cuatro criterios citados a continuación:

1. Presencia de fiebre o historia reciente de fiebre aguda
2. Tendencia a la hemorragia, evidenciada al menos por:
 - a. Una prueba de torniquete positiva (para evaluar fragilidad capilar);
 - b. Evidencia de petequia, equimosis o púrpura;
 - c. Evidencia de sangrado por mucosas, tracto gastrointestinal, sitios de inyección u otros sitios
3. Conteo plaquetario igual o menor a $100,000/\text{mm}^3$ o menos.
4. Evidencia de fuga capilar debido al aumento en la permeabilidad vascular manifestado por lo menos con uno de los siguientes criterios:
 - a. Un valor de hematocrito igual o mayor al 20 % del esperado para la edad, sexo y población
 - b. Otros signos comunes de fuga capilar, como derrame pleural, ascitis e hipoproteinemia.

La definición clínica de SCD en pacientes con DH requiere evidencia de falla circulatoria manifestada al menos por los siguientes signos y síntomas:

- Pulso rápido y débil
- Una diferencia entre presión sistólica y presión diastólica de 20 mmHg o menos.
- Hipotensión para la edad
- Piel fría, sudorosa y tensa.

La OMS ha estratificado en grados de severidad el DH. Se describen cuatro estadios de severidad:

DH grado I: Fiebre acompañada de síntomas constitucionales no específicos; la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positiva y/o magullamiento fácil.

DH grado II: Sangrado espontáneo usualmente manifestadas en piel u otro tipo de hemorragias más las manifestaciones presentadas en el DH grado I

DH grado III: Falla circulatoria manifestada por pulso rápido, débil y acortamiento en la presión de pulso o hipotensión, con presencia de piel fría y agitación.

DH grado IV: Choque profundo con presión sanguínea o pulso indetectable.

Según la experiencia en pacientes pediátricos del Sur-Este Asiático, el hígado es usualmente palpable en la fase temprana de la enfermedad y varía de tamaño llegando a palparse hasta 2 a 4 centímetros por debajo del reborde costal. Aunque el tamaño del hígado no se correlaciona con la severidad de la enfermedad, la presencia de hepatomegalia es mas frecuente en pacientes con choque (92). En América, la frecuencia de hepatomegalia en infecciones por dengue es variable, con un rango de 10 % hasta 83,8 % (93,94).

El recuento de leucocitos puede ser variable al inicio de la enfermedad, pudiendo ir desde leucopenia hasta una leve leucocitosis, pero una reducción en el recuento total de leucocitos es observada cerca la finalización de la fase

febril. Antes de la defervescencia o el choque es común encontrar linfocitosis con presencia de linfocitos atípicos. Se observa frecuentemente leve albuminuria y sangre oculta en heces (93).

92. Ibid (57).

93. Uehara PM, da Cunha RV, Oliveira GR, e de Oliveira PA. Envolvimento hepático em pacientes com dengue hemorrágico: manifestação rara? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(6): 544-547, nov-dez, 2006

94. Cortiñas MG, González DV, Cordero JC, Oliveiras MLL. Dengue hemorrágico. Estudio clínico de 200 pacientes. Revista Cubana de Medicina 38: 13-18, 1999

Se han reportado hallazgos raros como la vida como la ruptura espontánea de bazo e infecciones del sistema nervioso central (95,96). Estas pueden presentarse tanto en FD como en cualquier estadio de DH (97). El virus del dengue puede ser agente causal de encefalitis viral (98).

La definición actual de DH deriva principalmente de las experiencias obtenidas en Bangkok desde 1975. Estos criterios han sido modificados y adaptados para las diferentes regiones y países de la OMS (99), como lo demuestran las guías realizadas para las Américas en 1994 (100), las guías realizadas en 1997 con base en las experiencias obtenidas del Sur-Este Asiático (101) y las guías realizadas en 1999 para el manejo de pacientes (102).

95. Pungjitprapai A, Tantawichien T. A fatal case of spontaneous rupture of the spleen due to dengue virus infection: case report and review. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008 May;39(3):383-6

96. Solomon T, Dung NM, Vaughn D, Kneen R, Thao LTT, Raengsakulrach B, Loan HT, Day NPJ, Farrar J, Myint KSA, Warrell MJ, James WS, Nisalak A, White NJ. Neurological manifestations of dengue infection. THE LANCET, Vol 355, March 25, 2000.

97. Kankirawatana P, Chokephaibulkit K, Puthavathana P, Yoksan S, Apintanapong S, Pong-thapisit. V. Dengue infection presenting with central nervous system manifestation. J Child Neurol 2000;15: 544-7.

98. Muzaffar J, Venkata Krishnan p, Gupta n, Kar P. Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone region. C a s e R e p o r t. Singapore Med J 2006; 47(11) : 975.

99. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 2008.

100. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Pan American Health Organization, Washington, DC, 1994 (Scientific Publication No. 548),

101. Ibid (29).

102. Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control, Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. New Delhi, WHO Regional Office for South-East Asia, 1999

En la actualidad, muchos clínicos se encuentran utilizando criterios modificados de la OMS por encontrarlos de difícil aplicación para los casos de DH. Ellos reportan que en ocasiones los pacientes no cumplen los cuatro criterios para ser clasificados en DH (103, 104,105). Se han reportado casos de infección por dengue en donde en sus formas mas severas se acompañan de choque e hipotensión en ausencia de trombocitopenia o signos de hemorragia.

En contraste con lo anterior, Bandyopadhyay y cols comentan que la baja sensibilidad de los criterios diagnósticos de la OMS podría ser atribuibles a la falla en la repetición de pruebas o examen físico en el momento apropiado, terapia temprana con líquidos intravenosos, la falta de recursos adecuados en una situación epidémica y, tal vez, a una superposición de las manifestaciones clínicas en los diferentes estadios del dengue (106). Según Rigau, se debe trabajar en tres puntos clave para estandarizar la definición de DH: 1.Redefinir el umbral de trombocitopenia; 2. Aclarar el valor y la práctica estandarizada de la prueba de torniquete y 3. Incorporar un criterio que mida el remplazo de líquidos intravenosos (107).

103. Bandyopadhyay S., Lum L.C. and Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health*. volume 11 no 8 pp 1238–1255 august 2006

104. Setiati TE, Mairuhu ATA, Koraka P, Supriatna M *et al.* A. Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infectious Diseases*. 2007, **7:22**)

105. Ibid (99).

106. Bandyopadhyay *et al.* Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*, 2006;11(8):1238-1255

107. Rigau J. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 297–302

En Colombia, Villar y cols (108) han trabajado en criterios diagnósticos que puedan predecir y diferenciar una infección por dengue de otro síndrome febril sin foco aparente con base en modificaciones realizadas a los criterios de la OMS, introduciendo como parámetros el conteo leucocitario $< 4000/\text{mm}^3$, conteo plaquetario $< 180,000/\text{mm}^3$ y características clínicas como exantema, ausencia de rinorrea, prueba de torniquete positiva, artralgias y ausencia de diarrea (108).

108. Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Criterios clínicos para diagnosticar el dengue en los primeros días de la enfermedad. *Biomédica* 2006;26:22-30

2.10 METODOS DE DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO PARA INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE

El diagnóstico de laboratorio para las infecciones por dengue se realiza mediante la detección específica del virus, antígenos virales, secuencia genómica y/o detección de anticuerpos en muestras pareadas de suero (109, 110, 111,112). Esto depende de dos etapas de la enfermedad: la primera es aquella que se relaciona con el periodo de viremia acompañado de antígenos NS1 en sangre; la segunda etapa corresponde a la fase temprana post-febril que dura unas pocas semanas cuando los anticuerpos IgM e IgG se encuentran en exceso en la sangre. Durante una infección primaria, la viremia puede coincidir más o menos con la fiebre, sin embargo, durante una infección secundaria, la duración de la viremia puede tardar 2 a 3 días, donde la presencia de NS1 en sangre permanece un poco más. (Figura 7).

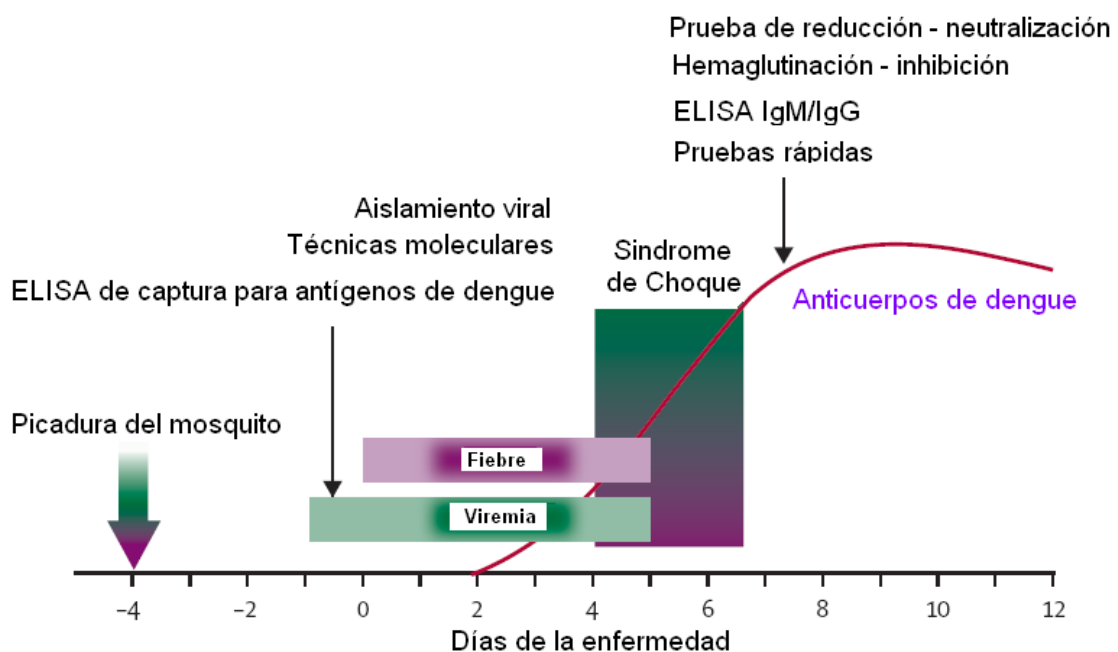
109. Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G & Vorndam, V. (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 545-551

110. Ibid (29)

111. Guzman, M. G., and G. Kouri. 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:621–627

112. Ibid (32).

Figura 7. Curso de la infección por dengue y tiempo de diagnóstico



Tomado de: Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370:1644-52

Los tres procedimientos usados con mayor frecuencia por los laboratorios para la confirmación de infecciones son: aislamiento viral y caracterización, detección de secuencias genómicas mediante ensayos con tecnología de amplificación de ácidos nucleicos y detección de anticuerpos específicos para dengue. Los diagnósticos moleculares basados en la PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR), RT-PCR anidada, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos o RT-PCR en tiempo real han venido reemplazando

gradualmente el aislamiento viral posicionándose como el nuevo estándar para la detección del virus del dengue en sueros de fase aguda. El *gold standard* hasta el momento sigue siendo el aislamiento viral en cultivos celulares (113).

113. Shu PY, Huang JH. Current Advances in Dengue Diagnosis. Clin. Diag. Lab. Immunol. July, 2004, Vol. 11, No.4. p. 642-650.

2.10.1 Aislamiento viral

Los métodos para aislamiento viral dependen de las locaciones disponibles en el laboratorio. La identificación del serotipo del virus infectante depende de un sistema de huésped sensible seguido por la indentificación de serotipos usando anticuerpos monoclonales de referencia. Dentro de los mecanismos utilizados para el aislamiento del virus se encuentran (114):

1. Inoculación intracraneal de ratones de 1 a 3 días de nacidos.
2. Cultivo del virus en diferentes líneas celulares de mosquitos (C6/36, AP-61, TR-248) y líneas celulares de mamíferos (células LLC-MK2, células vero).
3. Inoculación directa en mosquitos (machos de *Ae. aegypti*, *Tx. splendens*).

2.10.2 Diagnóstico molecular

Las técnicas de biología molecular más utilizadas y conocidas son las la RT-PCR anidada de dos pasos, reportada por Lanciotti (115) y su modificación a un solo paso para la detección y tipificación del virus descrita por Harris y cols

(116). Estas técnicas tienen la ventaja de detectar y diferenciar los cuatro serotipos del virus mediante el análisis de los tamaños únicos de los amplicones en el gel de agarosa.

114. Samuel PP & Tyagi BK. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. Indian J Med Res 123, May 2006, pp 615-628

115. Ibid (109)

116. Harris, E., T. G. Roberts, L. Smith, J. Selle, L. D. Kramer, S. Valle, E. Sandoval, and A. Balmaseda. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J. Clin. Microbiol. 36:2634–2639

EL PCR en tiempo real (RT- PCR) es reportado como una técnica de gran utilidad en la detección del virus en sueros de fase aguda. Esta presenta ventajas sobre las técnicas de biología molecular mencionadas anteriormente tales como mayor rapidez, capacidad de proveer resultados cuantitativos, una menor tasa de contaminación, mayor sensibilidad y especificidad y fácil estandarización (117).

2.10.3 Diagnóstico serológico

La confirmación diagnóstica mediante estudios serológicos comprende dos mecanismos: 1. Detección de antígenos y/o 2. Detección de anticuerpos.

La dificultad de realizar un diagnóstico serológico radica en (117):

1. Los pacientes pueden tener infecciones múltiples y secuenciales con los cuatro serotipos del dengue a consecuencia de debilidad en la protección cruzada de anticuerpos neutralizantes.
2. Las infecciones múltiples y secuenciales por flavivirus hacen que el diagnóstico diferencial se dificulte por la presencia de anticuerpos preexistentes.

3. Los anticuerpos IgG presentan alto grado de reactividad cruzada para antígenos homólogos y heterólogos de flavivirus.
4. En el caso de no contar con muestras pareadas de suero, es difícil discriminar entre una infección reciente de una infección aguda.

117. Ibid (113)

Se han hecho grandes avances en el análisis de la compleja respuesta de antígenos y anticuerpos, mediante el desarrollo de métodos que tienen como blanco las proteínas estructurales y no estructurales del virus para el diagnóstico serológico de las infecciones dengue.

Un diagnóstico serológico inequívoco depende del incremento significativo (cuatro veces o más) en los títulos de los anticuerpos específicos que halla entre una muestra de fase aguda y otra en fase convaleciente (118).

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

Se ha utilizado para este propósito Ensayos de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzimas (ELISA) y dot-blot dirigidos a antígenos de envoltura y membrana (E/M) y NS1. Estos ensayos han demostrado la alta concentración de antígenos E/M y NS1 en forma de complejos inmunes que pudieran ser detectados en pacientes en fase aguda tanto en infecciones primarias como en secundarias, incluso hasta 9 días de haber iniciado los síntomas (119). Se ha comprobado que la proteína NS1 pudiera ser de gran utilidad en el diagnóstico temprano para dengue (120,121).

118. Ibid (28).

119. Ibid (113).

120. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, *et al.* Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4154-9

121. Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, *et al.* High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol.* 2001 Nov;65(3):553-60

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Se han descrito varios métodos para la detección serológica de anticuerpos específicos contra el virus del dengue, que incluyen: prueba de inhibición – hemaglutinación (122), prueba de neutralización (123), inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (124,125), ELISA (126), fijación del complemento (127), prueba de dot-blot (128), Western blotting (129) y la prueba de inmunocromatografía rápida. De todas estas, las ELISAS de captura para IgM e IgG, las ELISAS indirectas cargadas de antígenos para IgM/IgG y la prueba de inhibición – hemaglutinación son las técnicas diagnósticas serológicas usadas con mayor frecuencia (130).

122. Clarke, D. H., and J. Casals. 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7:561–573

123. Russell, P. K., A. Nisalak, P. Sukhavachana, and S. Vivona. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 99:285–290

124. Vathanophas, K., W. M. Hammon, R. W. Atchison, and G. E. Sather. 1973. Attempted type specific diagnosis of dengue virus infection by the indirect fluorescent antibody method directed at differentiating IgM and IgG responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:697–702

125. Romero-Vivas C.M.E., Leake C.J, Falconar AKI- Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Medical and Veterinary Entomology* (1998) 12, 284-288

126. Burke, D. S., A. Nisalak, and M. A. Ussey. 1982. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 15:1034–1042

127. Gubler, D. J., and G. E. Sather. 1988. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 291–322. *In* A. Homma and J. F. Cunha (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

128. Cardoso, M. J., T. Phaik, and N. Sham. 1988. Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of antidengue antibodies. *J. Virol. Methods* 22:81–88

129. Kuno, G., A. V. Vorndam, D. J. Gubler, and I. Gomez. 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. *J. Med. Virol.* 32:102–108

130. *Ibid* (113)

La ELISA de captura IgM/IgG específica para antígenos de envoltura y membrana (E/M) se ha convertido en el ensayo más poderoso en cuanto al diagnóstico serológico de las infecciones por el virus del dengue debido a su alta especificidad, sensibilidad, simplicidad y su viabilidad de automatización (131, 132, 133, 134).

Se han comercializado muchos kits con base en esta técnica. Estos han mostrado alta especificidad y sensibilidad (135,136). Sin embargo, su desventaja radica en que en una muestra única de suero, las infecciones recientes podrían informarse como agudas, considerando que la IgM puede detectarse hasta por 3 meses (137,138)

131. Groen, J., P. Koraka, J. Velzing, C. Copra, and A. D. M. E. Osterhaus. 2000. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:867–871.

132. Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke. 1989. An enzymelinked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese.

133. Kuno, G., I. Gomez, and D. J. Gubler. 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods* 33:101–113.

134. Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. 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

135. Cuzzubo A, Vaughn DW, Nisalka A, Solomon T. *et al.* Comparison of PanBio Dengue Duo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and MRL Dengue Fever Virus Immunoglobulin M Capture ELISA for Diagnosis of Dengue Virus Infections in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* Sept. 1999, p. 705-712

136. Porter K., Widjaja S., Lohita HD., *et al.* Evaluation of a Comercially Available Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Diagnosing Acute Dengue Infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* Sept. 1999, p. 741.744

137. Vaughn DW., Green S, Kalajanoorj S, *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 81:2-9

138. Ocazonez R, Cortés F, Villar LA. Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la relación del suero y la prueba serológica. *Colombia Médica.* Vol.36 No.2, 2005 (Abril-Junio

Para evitar falsos negativos hay que tener en cuenta que en pacientes con infección secundaria, los niveles de IgM son significativamente mas bajos que en aquellos con infección primaria (139). Es por esto que es necesario la titulación de ambos anticuerpos (IgM/IgG) para una confirmación diagnóstica (140).

Recientemente se han hecho investigaciones en donde es posible diagnosticar infección por dengue mediante una prueba rápida utilizando anticuerpos monoclonales para NS-1 en formato ELISA, con el fin de obtener antígenos NS-1 en sangre. Esta prueba rápida aumenta su sensibilidad cuando se combina con pruebas que detecten anticuerpos para NS-1 (141). La NS-1 puede ser usada eficientemente en técnicas de ELISA para caracterizar infecciones primarias y secundarias (142).

139. Ibid (29)

140. Sa-NGasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakij S, Pattanakul K, Sawanpanyalert P, Kurane I. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol Infect.* 2006 Aug;134(4):820-5. Epub 2005 Dec 22

141. Xu H, Di B, Pan YX, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2872–78.

142. Shu PY, Chen LK, Chang SF, 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. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10: 622–30.

2.10.4 Radios de densidad óptica

Innis y cols propusieron clasificar las infecciones por el virus del dengue en primarias y secundarias mediante la determinación de los radios de las unidades para anticuerpos IgM sobre los radios de las unidades para anticuerpos IgG contra el virus del dengue. Ellos demostraron que los sueros en fase aguda de los pacientes con infección primaria tenían radios de IgM/IgG más altos mientras los pacientes con infecciones secundarias tenían radios de IgM/IgG más bajos (143).

Varias modificaciones fueron realizadas a este método, simplificando el cálculo de radios IgM/IgG directamente, sin necesidad de pasarlo a unidades (144,145). Recientemente, Falconar y cols propusieron ajustes en los radios de densidad óptica, los cuales permitieron discriminar exitosamente entre una infección primaria y secundaria haciendo uso de una sola muestra de suero. Una tasa de aislamiento del 100 % permite la anulación en la recolección de una segunda muestra de suero para confirmación por incremento cuádruplo de títulos de IgM o IgG (146).

143. Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke. 1989. An enzymelinked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 418–427.

144. Ibid (142).

145. Shu, P.Y., and J.H. Huang. 2004. Current avances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:642-650.

146. Ibid (43)

2.11 MANEJO DE PACIENTES CON FD Y DH DURANTE FASE FEBRIL

Durante la fase febril inicial, no es posible distinguir entre FD y DH. El tratamiento para ambos es el mismo. Este va enfocado a terapia de soporte y paliativa (147):

- Descanso
- Paracetamol (Acetaminofén), no más de cuatro veces en 24 horas, con base en la edad para fiebre mayor de 39 °C.
- No administrar Aspirina o Ibuprofeno. La Aspirina puede causar gastritis y/o sangrado. En niños, el síndrome de Reye puede ser una complicación seria.
- No administrar antibióticos.
- Terapia de rehidratación oral para pacientes con deshidratación moderada causada por vómito o temperatura alta.

En niños con signos de algún grado de deshidratación, es preferible las soluciones de rehidratación oral que se usan comúnmente para el tratamiento de las enfermedades diarreicas. Luego de haber sido corregida la

deshidratación, se debe administrar terapia de mantenimiento oral a una tasa de 80 – 100 mg/kg de peso corporal en las próximas 24 horas. Se debe continuar la lactancia materna en conjunto con la terapia de rehidratación en lactantes. En los adultos se debe mantener una ingesta de 2,5 a 4 L por día.

147. Ibid (102)

Debe hacerse un cuidadoso seguimiento para vigilancia de las complicaciones por lo menos dos días después de la recuperación de la fiebre. Este es el periodo en donde ocurren las complicaciones que amenazan con la vida del paciente. Los pacientes y convivientes deben estar informados si ocurren los siguientes eventos: dolor abdominal severo, heces negras, sangrado en piel o por la nariz o encías, sudoración y piel fría. Deben ser llevados al hospital de inmediato si alguno de ellos ocurre (148).

2.12 MANEJO DE PACIENTES CON FD Y DH DURANTE FASE AFEBRIL

Fiebre dengue: Los síntomas constitucionales de los pacientes con FD después de la desaparición de la fiebre son similares a los que se presentan en la fase febril. Muchos pacientes se recuperan sin complicaciones. El manejo de estos pacientes es igual al que se le da en fase febril (148).

Dengue Hemorrágico Grado I y II: Al igual que FD, los síntomas de los pacientes con DH Grado I y II son similares a los que se presentan en fase febril. Los hallazgos clínicos más la trombocitopenia y la

hemoconcentración o, aumento en el hematocrito son suficientes para establecer un diagnóstico de DH. Durante esta fase, el paciente deberá ser observado por lo menos 2-3 días posterior a la disminución de la temperatura y reportar la aparición de eritema en piel, sangrado por la nariz o encías, manchas azules en la piel y heces negras. Si se presentan, el paciente debe ser llevado al servicio de urgencias sin demora.

148. Ibid (102)

La principal característica que diferencia el DH de FD es incremento en la permeabilidad vascular resultante en fuga plasmática desde el compartimiento intravascular hasta el espacio extravascular (149).

Por lo general, los pacientes con DH grado I no requieren terapia con líquidos intravenosos. La terapia de rehidratación oral es suficiente. Los líquidos intravenosos deben ser administrados cuando se presente vómitos profusos o intolerancia a la vía oral. Los pacientes con DH grado I que no tengan facilidad para desplazarse desde su domicilio hasta una institución de salud deben quedarse hospitalizados (150).

Durante la fase afebril, las complicaciones vistas en pacientes con DH grado II, además de las vistas en DH grado I son: dolor abdominal, heces oscuras, epistaxis, sangrado por encías, sangrado continuo por sitios de venipunción. Inmediatamente tras la hospitalización se debe realizar un hemograma para medir el conteo plaquetario y hematocrito de tal manera que se evalúe la condición del paciente. Una reducción del conteo plaquetario $\leq 100,000/\text{mm}^3$ usualmente precede incremento en el hematocrito. Un incremento en el

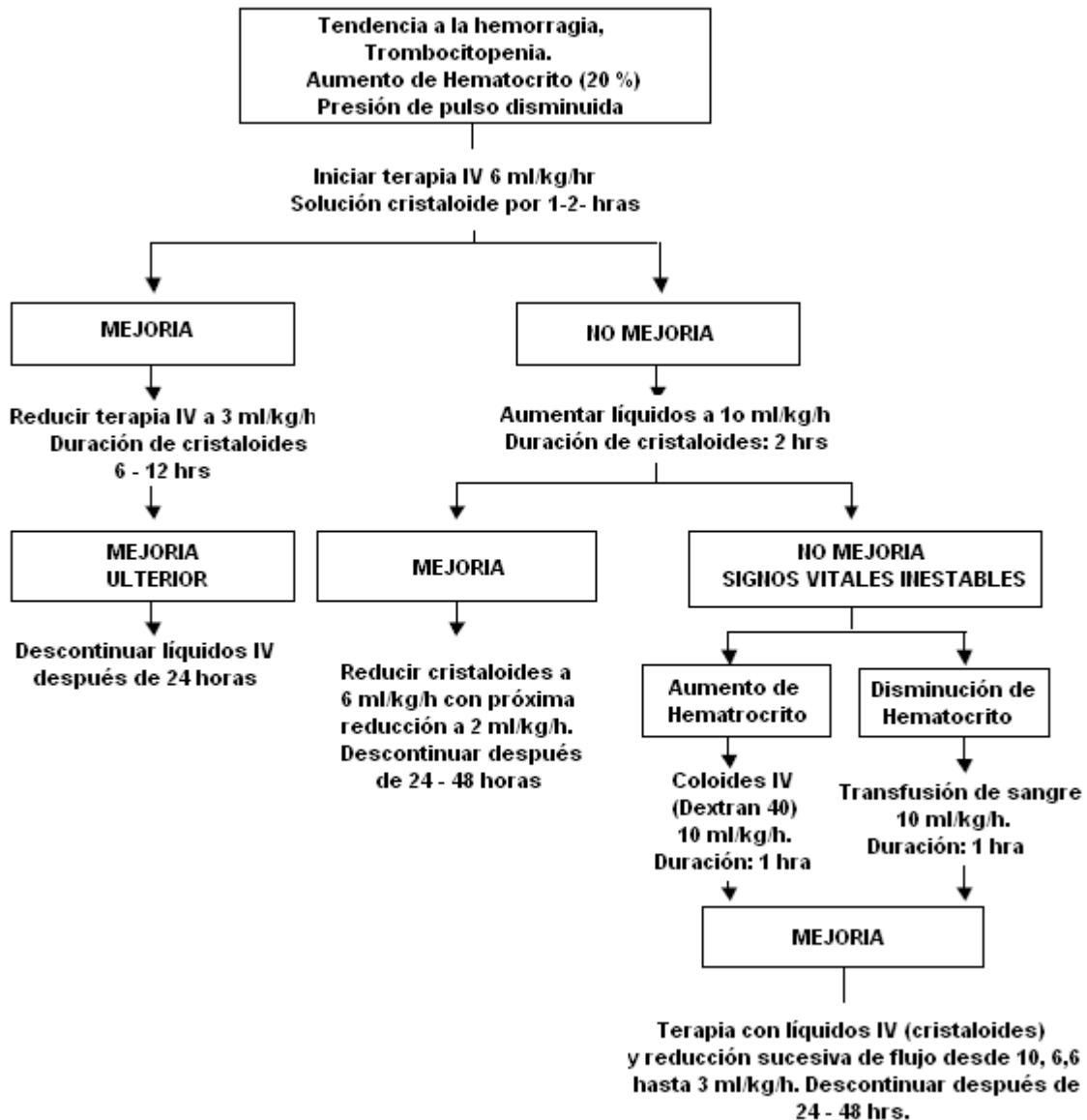
hematocrito mayor igual al 20 % refleja una pérdida plasmática significativa e indica la necesidad de terapia intravenosa. El remplazo temprano de volumen con líquidos intravenosos de tipo cristaloides puede reducir la severidad de la enfermedad y prevenir el choque (149).

149. Halstead SB. (1989) Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage: a pathogenic cascade. *Reviews of Infectious Diseases* 11 (Supp. 4), S830 – S839

150. Ibid (102)

No se recomienda terapia intravenosa antes de evidenciarse fuga capilar. En casos leves a moderados de DH grado II, la terapia con líquidos intravenosos debe administrarse por un periodo de 12 a 24 horas en hospitales pequeños o unidades de corta estancia de grandes hospitales. (Figura 8)

Figura 8. Algoritmo para remplazo de volumen en pacientes con DH grado I y II



Tomado de: Guidelines for Treatment of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals. World Health Organization. Regional Office for South-East-Asia. New Delhi. 1999.

Dengue Hemorrágico Grado III y IV (Síndrome de choque por dengue)

El síndrome de choque por dengue (SCD) es una emergencia médica. La administración inmediata de expansores plasmáticos para el remplazo de volumen es esencial. Los niños pueden choquearse durante un periodo de 48 horas (150).

Solo dos estudios aleatorios, doble ciego, han investigado el efecto de diferentes regímenes con cristaloides y coloides en el SCD (151). El primero fue un estudio piloto en el cual 50 niños recibieron una de cuatro soluciones (6 % de Dextran 70, 3 % de gelatina, Lactato Ringer o 0,9 % de solución salina) por un periodo de 2 horas en la reanimación inicial. El grupo de pacientes al que se le administró soluciones coloides mostraron notable mejoría dado por mejoría en el índice cardiaco, hematocrito y presión arterial al finalizar la infusión, en comparación al grupo que recibió cristaloides. Todos los niños se recuperaron, pero no se examinó las diferencias del efecto sostenido entre las cuatro soluciones estudiadas (152). A este le siguió otro estudio en 230 niños con SSD quienes recibieron tratamiento con líquidos similares al anterior. Este estudio no mostró ventajas en utilizar un tipo de solución en particular (153).

150. Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1997. Chapter 3, pag 24 - 33

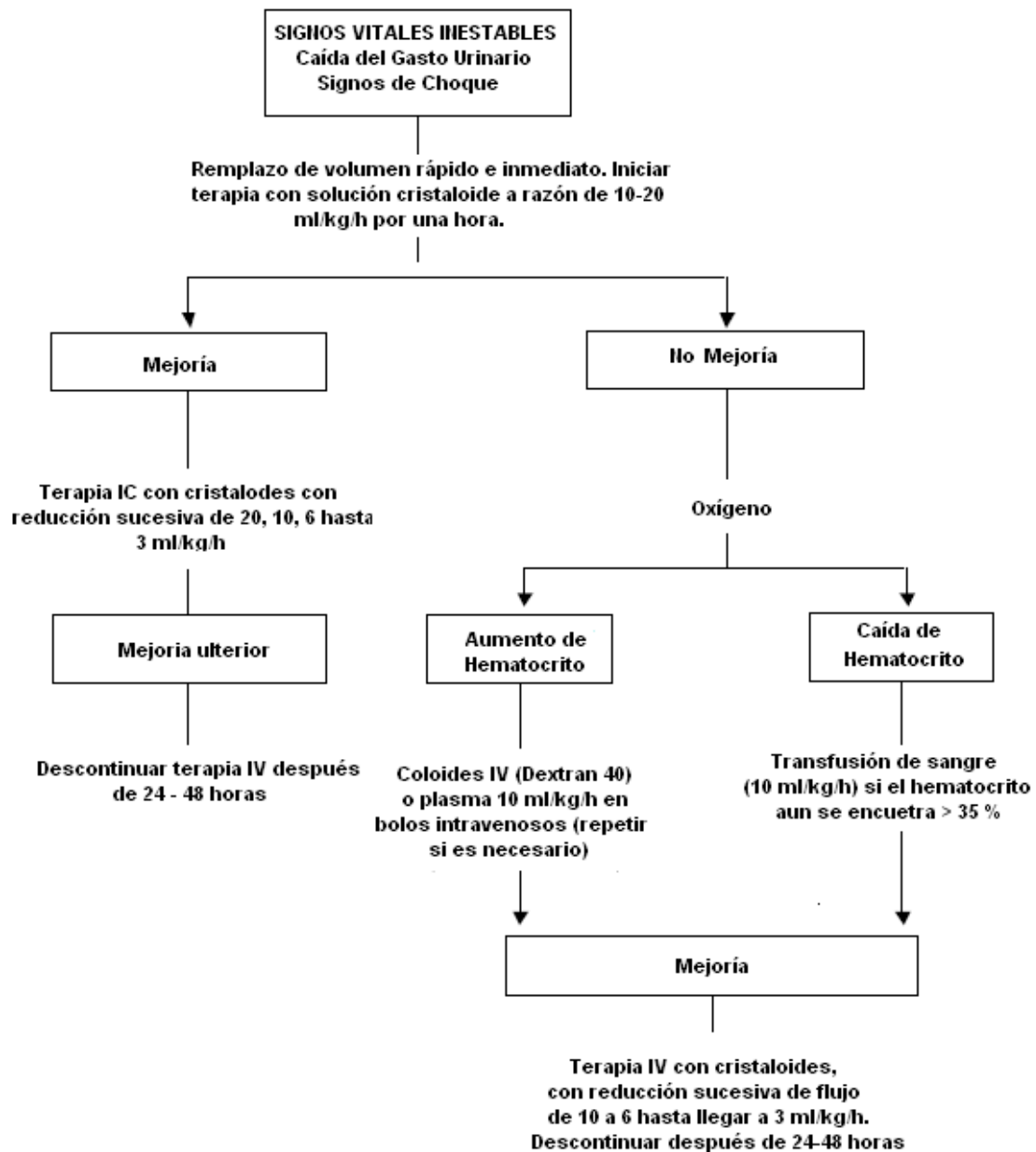
151. Wills BA, Dung NM, Loan HT, Tam DTH, Thuy TTN, Minh L, Diet TV, Hao NT, Chau NV, Stepniowska K, White NJ, Farrar J. Comparison of Three Fluid Solutions for Resuscitation in Dengue Shock Syndrome. *n engl j med* 353;9. September 1, 2005.

152. Dung NM, Day NP, Tam DT, et al. Fluid replacement in dengue shock syndrome: a randomized, double-blind comparison of four intravenous-fluid regimens. *Clin Infect Dis* 1999;29:787-94

153. Ngo NT, Cao XT, Kneen R, et al. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis* 2001;32:204-13.

La evidencia recomienda reanimación inicial con lactato Ringer en niños con SCD moderado a severo. Incluso en pacientes con fuga capilar, las soluciones isotónicas cristaloides son tan efectivas como las soluciones coloides en la mayoría de los pacientes. (Figura 9)(154,155).

Figura 9. Algoritmo para remplazo de volumen en pacientes con DH grado I y II



154. Ibid (151)

155. Ibid (102)

La administración de líquidos intravenosos debe suspenderse cuando el hematocrito cae a un nivel aproximadamente del 40 %, con signos vitales estables. Al cesar el estado de choque, ocurre la reabsorción del plasma extravasado. La no suspensión de líquidos intravenosos podría conducir a hipervolemia, edema pulmonar o falla cardíaca. Es importante que en este

punto una caída de hematocrito no sea interpretada como hemorragia interna (156).

En un estudio realizado en menores de 13 años, la mayoría de las complicaciones pulmonares se observaron después de la administración de líquidos endovenosos o transfusiones. Los pacientes con edema pulmonar mostraron además, edemas periféricos, signos de hipervolemia en los casos que se prolongó la terapia con líquidos endovenosos después de la fuga capilar (157).

Se debe determinar la presencia de hiponatremia y acidosis en pacientes severamente comprometidos. La no corrección de estos parámetros podría conducir a una coagulación intravascular diseminada (156).

La terapia con oxígeno es obligatoria hasta que el estado de choque haya cesado. Durante este periodo se deben registrar los parámetros hemodinámicos y temperatura cada 15 – 30 minutos (158).

156. Ibid (150).

157. Méndez A, González G. Dengue Hemorrágico en niños: diez años de experiencia clínica. *Biomédica* 2003;23:180-93

158. Ibid (102).

Los pacientes en estado de choque profundo con pulso, presión arterial indetectable y aumento sostenido del hematocrito, debe hacerse transfusión en bolos de 10 ml/kg. Cuando las plaquetas llegan a un nivel por debajo del rango 5,000 – 10,000 mm³, debe hacerse transfusión de plaquetas (159).

Se documentan otras terapias no convencionales para el tratamiento de infecciones por dengue tales como el uso de corticoides. No se recomienda el manejo empírico o indiscriminado de estos. Se necesitan de estudios aleatorios, controlados que evalúen el beneficio en infecciones por dengue (160).

159. Ibid (102).

160. Rajapakse S. Corticosteroids in the treatment of dengue illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2008).

Indicaciones para hospitalización (161)

Según la OMS, la hospitalización para la terapia de reposición de volumen por bolos intravenosos debe ser necesaria cuando ha ocurrido deshidratación

significante (> 10 % de peso corporal) y se requiere de una rápida expansión de volumen. Los signos de deshidratación significativa incluyen:

- Taquicardia
- Aumento en el tiempo de llenado capilar (> 2 segundos)
- Piel fría, pálida y sudorosa
- Disminución en los pulsos periféricos
- Cambios en el estado mental
- Oliguria
- Elevación repentina del hematocrito o hematocrito continuamente elevado tras la administración de fluidos.
- Acortamiento de la presión de pulso (< 20 mmHg (2,7 kPa))
- Hipotensión (un hallazgo final que representa la no corrección del choque).

161. Ibid (150)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar clínica y serológicamente las infecciones por el virus del dengue en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana durante los años 2006 – 2007.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir los aspectos socio - demográficos de pacientes sospechosos de infecciones por el virus del dengue en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana.
- Clasificar los casos sospechosos en FD y DH con base en los criterios de la Organización Mundial de la Salud.
- Confirmar las infecciones por el virus del dengue con base en radios de densidad óptica y comparación de títulos IgM/IgG en muestras pareadas de suero.
- Caracterizar las manifestaciones clínicas (signos y síntomas) de los pacientes confirmados de la ciudad de Barranquilla y área metropolitana.
- Asociar las infecciones primarias y secundarias con la presentación clínica de la enfermedad.
- Estimar la especificidad y la sensibilidad de la prueba de torniquete como parámetro predictivo de la ocurrencia de DH.

- Validar los radios de densidad óptica que clasifiquen correctamente las infecciones primarias y secundarias en muestras de suero de fase aguda.

4. METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.1.1 *Población diana*

Pacientes provenientes de la ciudad de Barranquilla y área metropolitana (Soledad, Malambo).

4.1.2 Población accesible

Pacientes que consultaron a uno de los siguientes puntos de captación:

- Hospital Pediátrico de Barranquilla (HPB)
- Hospital Universidad del Norte (HUN)
- Secretaría Distrital de Salud Pública (DISTRISALUD)

4.1.3 Población elegible

Todas las personas que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de Inclusión:

- Paciente con síndrome febril sin foco aparente.
- Dos criterios para caso sospechoso de Fiebre Dengue o Sospecha de Dengue Hemorrágico.
- Paciente en fase aguda que consulte dentro de los primeros 7 días de la enfermedad.

Criterios de Exclusión:

- Negación a la firma de consentimiento informado.
- Núcleo familiar disfuncional.

4.2 INSTRUMENTO

Se utilizó una ficha epidemiológica (anexo 1) que registró aspectos socio-demográficos, epidemiológicos, clínicos y parámetros bioanalíticos. Notifica el día de inicio de los síntomas y a que día, después de haber iniciado la enfermedad, corresponden las muestras de suero recolectadas. También registra información referente a factores de riesgo para síndromes febriles sin foco aparente diferente a dengue (Leptospirosis, Hantavirus).

4.3 LOGÍSTICA

4.3.1 *Puntos de captación de pacientes*

Se tomaron tres entidades de salud:

- Hospital Universidad del Norte (Soledad)
- Hospital Pediátrico de Barranquilla (Barranquilla)
- Secretaría Distrital de Salud Pública (Barranquilla)

Los pacientes remitidos de estas tres entidades a otra institución fueron observados durante su estancia hospitalaria previo consentimiento de entidad receptora.

4.3.2 *Socialización del proyecto*

Se realizaron visitas y charlas educativas en las instituciones que sirvieron como punto de captación. Estas charlas fueron recibidas por auxiliares de enfermería, enfermeras jefes, bacteriólogos, técnicos de

laboratorio, médicos internos, médicos de urgencia, médicos especialistas y todo personal en salud con potencial de enrolar pacientes en el estudio.

Los puntos claves a tratar en estas visitas fueron:

- Criterios para inclusión de pacientes
- Manejo de muestras y cadena de frío
- Notificación de casos

4.3.3. Consideraciones éticas

Se utilizó un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Universidad del Norte para pacientes ambulatorios (anexo 2). Este consentimiento informado fue leído y explicado a todo adulto o responsable de menor de edad participante en el estudio hasta su total entendimiento.

Para pacientes hospitalizados se utilizó un formato especial (anexo 3) aprobado por el comité de ética de la Universidad del Norte. Dicho consentimiento tenía cuatro partes:

1. Información acerca el estudio de Investigación
2. Formato de consentimiento informado
3. Consentimiento adicional
4. Consentimiento de acceso al contenido de la historia clínica

4.4 CLASIFICACIÓN DE CASOS

Los pacientes fueron agrupados en casos sospechosos y probables de FD/DH con base en los criterios clínicos de la OMS. Estos criterios se definen de la siguiente manera:

4.4.1 *Caso sospechoso de FD*

Enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones:

- Dolor de cabeza
- Dolor retro – orbital
- Mialgia
- Artralgia
- Eritema
- Manifestaciones Hemorrágicas
- Leucopenia

4.4.2 *Caso sospechoso de DH*

- Fiebre o historia de fiebre aguda, de 2 a 7 días de evolución, ocasionalmente bifásica
- Tendencia a hemorragias, manifestada por al menos una de las siguientes características:

- Prueba de torniquete positiva
 - Petequias, equimosis o púrpura
 - Sangrado de mucosas, tracto gastrointestinal, sitios de inyecciones u otros
- Trombocitopenia (100,000 células por mm³ o menos)
 - Evidencia de fuga capilar debido al incremento de la permeabilidad capilar demostrado por al menos una de las siguientes características:
 - Aumento del hematocrito por encima del 20 % del normal para la edad, sexo y población.
 - Depleción del hematocrito igual o menor del 20 % posterior tratamiento de remplazo de volumen.
 - Signos de fuga capilar como derrame pleural, ascitis e hipoproteinemia

La severidad de los casos de DH se clasificó al egreso del paciente de la institución hospitalaria con base en las siguientes características:

DH Grado I: Fiebre acompañada de síntomas constitucionales inespecíficos; la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positiva o enrojecimiento fácil.

DH Grado II: Sangrado espontáneo más las manifestaciones para DH grado I, usualmente en piel u otras hemorragias.

DH Grado III: Falla circulatoria manifestada por pulso rápido, débil y acortamiento en la presión de pulso o hipotensión, con presencia de piel fría, sudorosa y letargia, dolor abdominal, vómito persistente, hepatomegalia > 2 cm.

DH Grado IV: Choque profundo con pulso o presión arterial indetectable, complicación de otros órganos tales como hígado y sistema nervioso central.

4.4.3 Caso probable de FD

Caso sospechoso de FD más las siguientes características:

- Una prueba positiva para anticuerpos IgM en un espécimen único de suero de fase aguda tardía o convaleciente, ya sea por prueba rápida o ELISA de captura para IgM.
- Ocurrencia en el mismo lugar y tiempo de otros casos confirmados de dengue.

4.4.4. Caso probable de DH

Caso sospechoso de DH más las siguientes características:

- Una prueba positiva para anticuerpos IgM en un espécimen único de suero de fase aguda tardía o convaleciente, ya sea por prueba rápida o ELISA de captura para IgM.
- Ocurrencia en el mismo lugar y tiempo de otros casos confirmados de dengue.

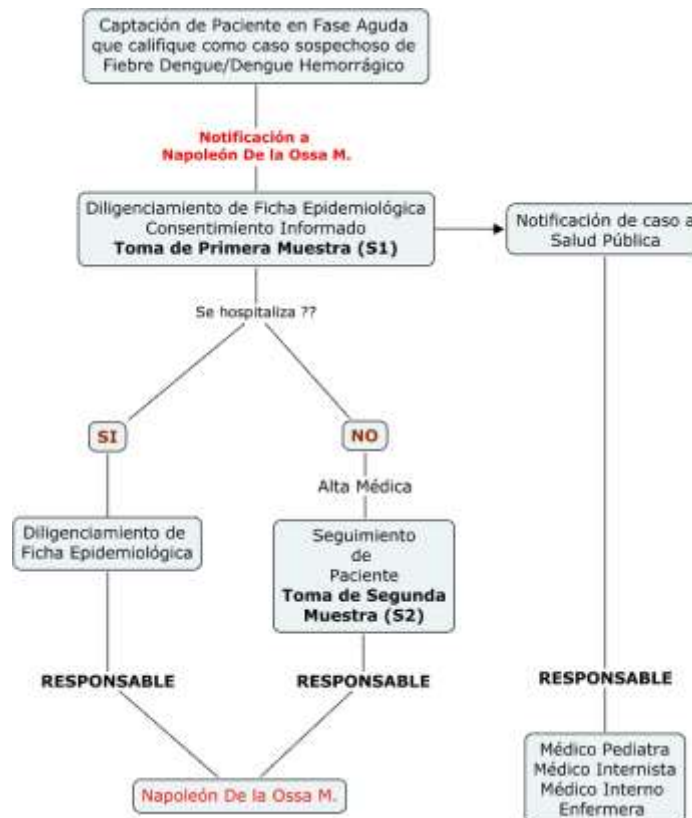
4.5 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

HUN – HPB

Realizada la captación del paciente en los servicios de urgencias, pediatría y medicina interna, el caso era notificado al coordinador del proyecto. Posterior firma del consentimiento informado, una primera muestra de suero (S1) en fase aguda de la enfermedad era tomada. Dos días después de la primera muestra y hasta el día 14, una segunda muestra (S2) de suero o plasma era tomada.

Los casos sospechosos de FD/DH eran notificados a las entidades de salud pública. (Figura 10).

Figura 10. Algoritmo de recolección de muestras – HUN – HPB



DISTRISALUD

Para la captación de pacientes febriles sospechosos de infecciones por dengue se realizaron salidas de campo a diferentes barrios de Barranquilla en conjunto con el equipo de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría Distrital de Salud Pública. Luego de una valoración clínica, el paciente era enrolado en el estudio.

Las muestras de suero en fase aguda fueron tomadas al momento de captación. Las segundas muestras de suero fueron recolectadas 2 días después y no más allá del día 14 de tomada la primera muestra. Para esto se realizó visita domiciliar a todo paciente captado en la comunidad.

4.5.1 Manejo de muestras

Las muestras de fase aguda (S1) fueron recolectadas en tubos estériles (**BD Vacutainer™**) sin aditivos, sin anticoagulante. El suero obtenido fue guardado en viales tapa rosca de 5 ml (**Nalgene® Cryoware™**) y almacenado en cajas de 100 puestos (**Nalgene® System 100™**) a temperatura de – 80 °C.

Las segundas muestras (S2) fueron recolectadas en tubos estériles con y sin anticoagulantes. Los tubos con anticoagulantes contenían K₃ EDTA (**Becton Dickinson VACUTAINER Systems, Franklin Lakes NJ**). Los sueros y plasmas recolectados fueron guardados en viales tapa rosca de 5 ml (**Nalgene® Cryoware™**) y almacenado en cajas de 100 puestos (**Nalgene® System 100™**) a temperatura de – 80 °C.

4.6 TÉCNICA DE LABORATORIO

ELISA DE CAPTURA IgM / IgG

Las infecciones por dengue fueron confirmadas mediante análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de captura para IgM e IgG humanas. Esta técnica fue realizada en todas las muestras una vez recolectado el último paciente del estudio. Los materiales, soluciones, reactivos y anticuerpos utilizados en el ensayo se citan en los anexos 4,

5 y 6 respectivamente. Los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio fueron gentilmente provistos por el Dr. Andrew Falconar.

PROCEDIMIENTO:

Se estandarizó cada paso del ensayo utilizando diferentes concentraciones de anti-anticuerpos (**Jackson ImmunoResearch**) y anticuerpos monoclonales con un panel de sueros positivos y negativos para dengue confirmados mediante aislamiento viral e inmunofluorescencia indirecta.

Para cada anticuerpo se obtuvo el máximo valor de Densidad Óptica (DO) en diferentes diluciones. El promedio máximo de DO fue determinado para identificar el título umbral ($DO_{max}/2$) en el cual podían ser identificados los anticuerpos del paciente. El punto de corte para identificarlos correspondió al título recíproco de cada anticuerpo en un 50% del \log_{10} . En este orden de ideas, los títulos de IgM e IgG por debajo del punto de corte se identificaron como negativos y por encima del punto de corte se identificaron como positivos.

PASO 1. CARGA DE PLACAS

Cada placa de ELISA (**Immulon® 4HBX**) fue cargada (50 μ l/pozo) con anticuerpos de conejo anti IgG humana (1.8mg/ml) (**Jackson Immunoresearch**) y anticuerpos de cabra anti IgM humana (1.2mg/ml) (**Jackson Immunoresearch**) a una concentración de 10 μ g/ml en una solución carbonada-bicarbonada de sodio (1 x) a un pH Ph de 9.8 (**Anexo 7**). Se seleccionaron placas diferentes para IgM e IgG. Después

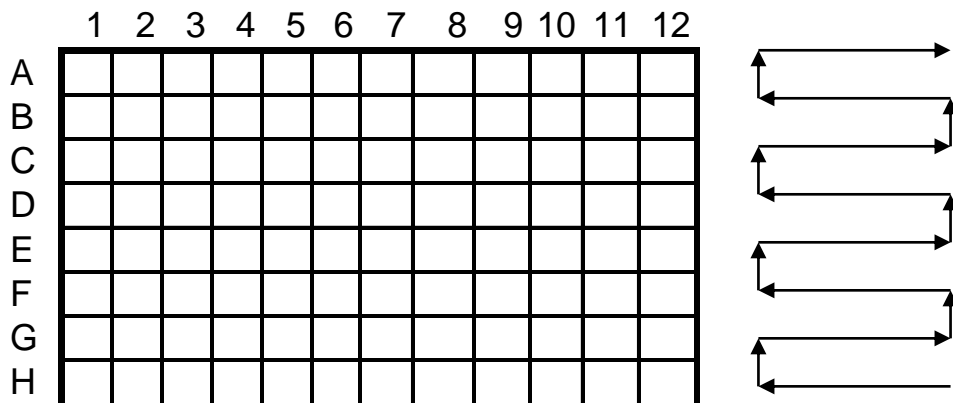
de cargar las placas estas se guardaron a diferentes temperaturas dependiendo el tiempo de almacenamiento:

Temperatura: 4 °C Tiempo de almacenamiento: Toda la noche
Temperatura: 28 °C Tiempo de almacenamiento: 2 horas
Temperatura: 37 °C Tiempo de almacenamiento: 1 hora

PASO 2. BLOQUEO

Luego de almacenadas las placas, se lavaron de 3 – 4 veces con solución compuesta por PBS y Tween al 0.05 % (vol/vol)(PBS/T). (Figura 11).

Figura 11. Dirección de los lavados en placas Immulon®4HBX



Durante los pasos de estandarización los lavados se realizaron en dirección al gradiente de concentración en que fueron puestos los anticuerpos en los pozos.

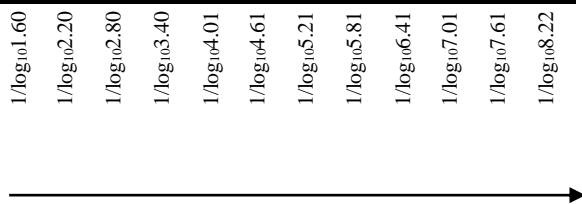
Posterior lavado de placas se agregó en cada pozo gelatina (**G 6144; Sigma**) al 1 % (p/vol) en PBS. Con esta solución se mantuvieron las placas a 28 °C durante 2 horas.

PASO 3. SUERO DE PACIENTE

En placas de microtitulación (**Immulon® 2HBX**) se realizaron diluciones seriadas de los sueros (S1 y S2). Estos fueron preparados en una solución compuesta por PBS/T (descrita en paso 2) y gelatina al 0.25 % (PBS/T/G). La relación suero/solución (PBS/T/G) en la primera dilución fue de 1/40. Cada dilución se expresó en escala logarítmica ($1/\log_{10}1.60$). Se realizaron entonces diluciones seriadas, aumentando 4 veces la dilución (4X) en cada columna de la placa (ejemplo: columna 1: 1/40; columna 2: 1/160; columna 3: 1/640 y así sucesivamente hasta llegar a la columna 12). (Figura 12).

Figura 12. Disposición de muestras (S1 y S2) con respectivas diluciones en placas de microtitulación

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Paciente 1 (S1)	A												
Paciente 1 (S1)	B												
Paciente 1 (S2)	C												
Paciente 1 (S2)	D												
Paciente 2 (S1)	E												
Paciente 2 (S1)	F												
Paciente 2 (S2)	G												
Paciente 2 (S2)	H												



Dirección de incremento en la dilución de los sueros (S1 y S2)

4 X

Posterior lavado de placas (como se indica en paso 2), se transfirieron 50 µl del suero diluido a cada pozo de las placas (**Immulon® 4HBX**) para IgM e IgG.

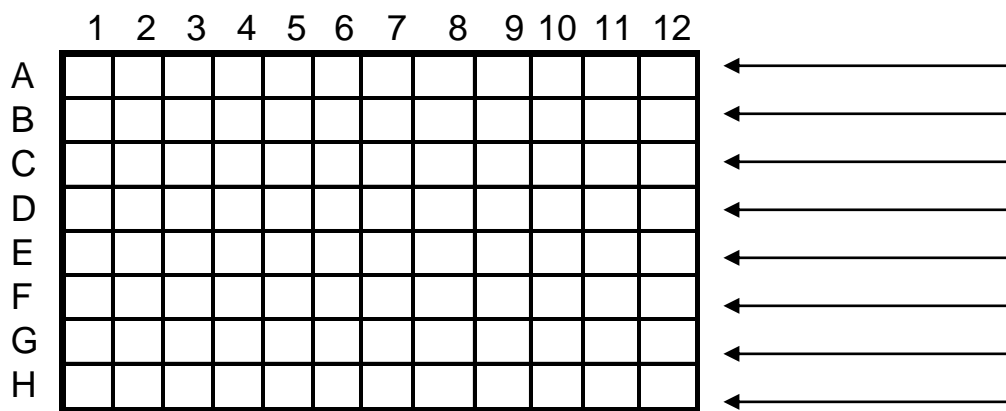
PASO 4. VIRUS DE DENGUE

Se utilizaron sobrenadantes de cultivos celulares (C6/36 *Aedes albopictus*) infectados con los siguientes prototipos del virus del dengue: DENV-1: Naru Island; DENV-2: New Guinea C; DENV-3: PR-1340; DENV-4: Dominica

Los sobrenadantes utilizados fueron provistos por el Dr. Andrew Falconar (162). Estos fueron recolectados al día 5 y 8 después de infectadas las células, cuando mostraron mayores cambios citopáticos. La infección fue comprobada mediante inmunofluorescencia indirecta (162).

Una mezcla de sobrenadantes (DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4) fue realizada en PBS/T/G a una dilución de 1/2.5 para cada serotipo. Posterior lavado de placas (figura 13), se transfirieron 50 µl de esta solución a las placas de ELISA (**Immulon® 4HBX**) para IgM e IgG.

Figura 13. Dirección de los lavados posterior incubación de sueros diluidos



Los lavados se realizan de abajo hacia arriba

Nota: Todos los lavados desde el paso 4 hasta el final del ensayo se realizan como se indica en la figura.

162. Ibid (42)

PASO 5. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los ensayos realizados para sueros de pacientes se procesaron con los anticuerpos monoclonales 2C5.1 (3.7 mg/ml) y 2C5.1 (4.30 mg/ml) por presentar mejor calidad a nivel de densidad óptica en la estandarización de la técnica. El anticuerpo monoclonal 2C5.1 (3.7 mg/ml) se utilizó a una dilución 1/10.000 en PBS/T/G; 2C5.1 (4.30 mg/ml) se trabajó a una dilución de 1/64.000.

Posterior lavado de placas se transfirieron 50 µl de esta solución en las placas de ELISA. Se incubaron por 1 hora a 37° C.

PASO 6. ANTICUERPO DE CABRA ANTI IgG DE RATÓN CONJUGADO CON PEROXIDASA

Se utilizó anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa a una concentración de 0.8 mg/ml. Para el ensayo fue diluido 1/1000 en solución PBS/T/G previamente descrita.

Posterior lavado de placas se transfirieron 50 µl de esta solución a las placas de ELISA. Se incubaron por 1 hora a 37° C.

PASO 7. SUSTRATO

Para dar inicio a la reacción se adicionó 50 µl de una solución sustrato (anexo 8) posterior lavado de placas.

La reacción es detenida con ácido sulfúrico (2.5 M) 10 minutos después de adicionado el sustrato. Cada placa fue leída (**MRX; Dynex**) a un rango de longitud de onda de 490 nm – 630 nm.

El resultado de cada paciente fue graficado y se determinó mediante cuantificación de títulos IgM / IgG si el paciente fue infectado por el virus del dengue. Las MAC y GAC fueron estandarizadas con sueros de pacientes con otras infecciones (*Leptospira, Plasmodium*). El promedio de la densidad óptica máxima para la IgM e IgG fue determinado con el objetivo de identificar el umbral del título, sobre o bajo el cuál éste considera un título para la IgM o IgG positivo o negativo respectivamente; este título fue determinado mediante la obtención del recíproco del $\log_{10}50\%$ ($\log_{10}t_{50}$) para la IgM y la IgG. Los pánels de los sueros control ($\log_{10}t_{50}$ de los sueros negativos mas tres desviaciones estándar) fueron utilizados para establecer el punto de corte del suero a una dilución (1/100) usados en la obtención de los radios de densidad óptica de la IgM/IgG. El patrón de respuesta inmune (infección primaria / infección secundaria) se determinó mediante el incremento igual o mayor a 4 veces de los títulos IgM (infección primaria) o IgG (infección secundaria) en muestras pareadas de suero.

4.7 EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Mediante la elaboración de tablas de contingencias en la aplicación se asociaron las características clínicas (presentación de la enfermedad, manifestaciones hemorrágicas, manifestaciones clínicas y hallazgos de

laboratorio) con las infecciones confirmadas por el virus del dengue y el tipo de respuesta inmune encontrada mediante ELISA de captura IgM/IgG.

4.8 EVALUACIÓN DE PRUEBA DE TORNIQUETE

Se realizó prueba de torniquete conforme los lineamientos de la OMS (1997) en pacientes sospechosos de infección durante su fase aguda. En pacientes hospitalizados, la prueba fue realizada diariamente hasta el egreso hospitalario.

Método: Se insufló el brazalete en el antebrazo a un punto medio entre la presión sistólica y diastólica durante 5 minutos. La prueba fue considerada positiva al observarse 20 o más petequias en un cuadrado de 2,5 cm. Se evaluó la precisión diagnóstica mediante sensibilidad y especificidad.

4.9 EVALUACIÓN DE RADIOS DE DENSIDAD ÓPTICA

Se obtuvieron los radios de densidad óptica en dilución 1/100 de sueros recolectados durante fase aguda temprana (día 0, 1, 2 y 3) y fase convaleciente. Se evaluó la efectividad en clasificar correctamente el tipo de infección mediante la escala propuesta por Falconar, Innis, Kuno y Shu tomando como referencia el tipo de infección obtenido mediante cuádruplo de títulos IgM (infección primaria) e /IgG (infección secundaria) (OMS, 1997).

4.10 PROCESAMIENTO DE DATOS

Se utilizó el software epi-info 6,04 con las aplicaciones EPED para creación de base de datos, ENTER para introducción de registros y ANALYSIS y STATCALC para análisis y asociación de variables.

El análisis de variables se realizó usando tablas de contingencia en la aplicación STATCALC.

5. RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

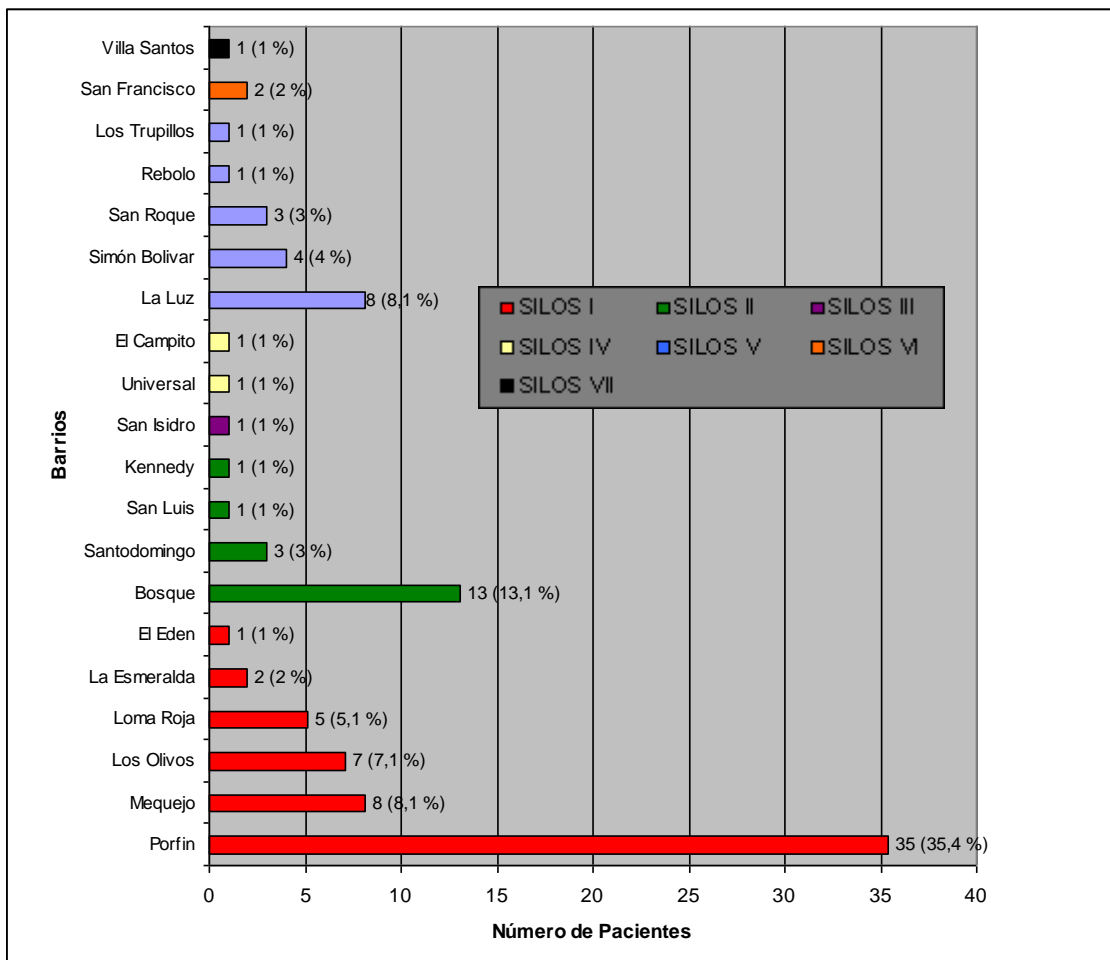
Se analizaron datos y muestras pareadas de 115 pacientes sospechosos de infecciones por el virus del dengue, provenientes del departamento del Atlántico (figura 14), principalmente de la ciudad de Barranquilla [86 % (99/115)] y área metropolitana correspondiente a los municipios de Soledad y Malambo [11.3 % (13/115)]. Tres miembros de una familia procedentes de Palermo (Magdalena) fueron enrolados en el estudio por la relevancia de los casos.

Figura 14. Mapa del departamento del Atlántico con municipios participantes



La ubicación de pacientes en la ciudad de Barranquilla se realizó mediante los Sistemas Locales Integrados en Salud (SILOS). El mayor número de casos sospechosos se encontró en barrios correspondientes a estratos socioeconómicos 1 y 2 ubicados en el SILOS I [58.6 % (58/99)]. El barrio Porfin obtuvo la mayor ocurrencia de pacientes [35/99 (35,4 %)] seguido del SILOS II (estratos socioeconómicos 2 y 3) [18,2 % (18/99)]. (Gráfica 1).

Gráfica 1. Distribución de pacientes entre los diferentes barrios de Barranquilla agrupados en SILOS (Sistemas Locales Integrados en Salud) durante el periodo 2006 - 2007

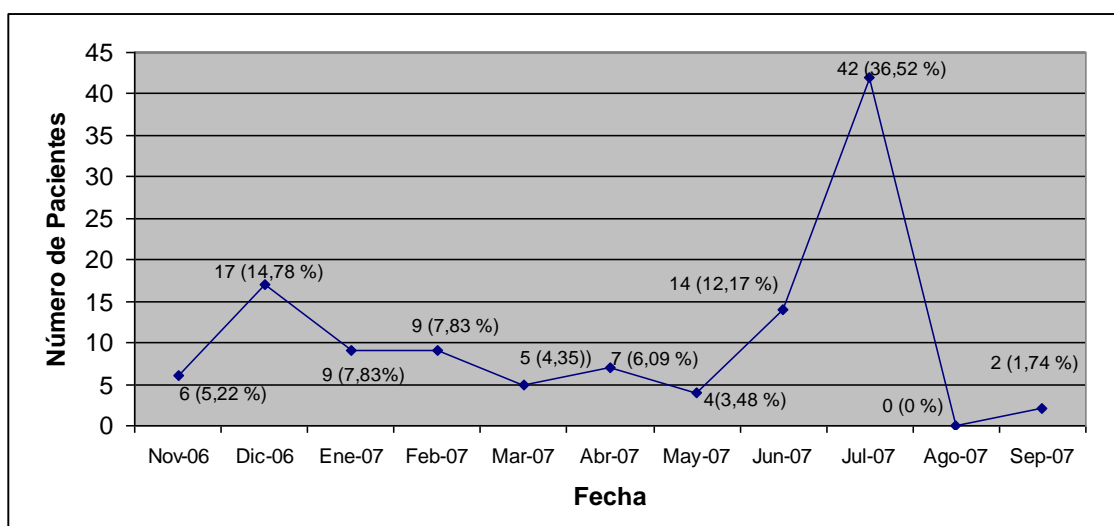


84 Se reportaron 10 pacientes sospechosos de infección por dengue en igual número de barrios del municipio de Soledad (Ciudadela Metropolitana, Costa Hermosa, Hipódromo, La Esperanza, La Floresta, Las Moras, Los Robles, Santa Inés, Villa, Vista Hermosa) y 3 casos en el municipio de Malambo (El Concord, El Tesoro, San Martín). Para el municipio de Palermo, se reportó la sospecha clínica en tres convivientes de un mismo domicilio ubicado en el barrio El Paraiso.

5.2 TIEMPO DE ESTUDIO

Se recolectaron muestras pareadas e información clínica de pacientes por un periodo de 9 meses (Noviembre de 2006 - Agosto de 2007). Se observó la mayor incidencia de casos durante los meses de Junio y Julio de 2007. (Gráfica 2).

Gráfica 2. Distribución de pacientes sospechosos de infecciones por el virus del dengue durante el periodo de recolección de muestras



5.3 ASPECTOS SOCIO-DEMOGRAFICOS

5.3.1 Edad y sexo

El mayor número de casos se registró en adolescentes [30/115 (26 %)], seguido de pre-escolares [25/115 (21,7 %)] y escolares [22/115 (19,1 %)] (tabla 1), siendo el sexo femenino el que registró mayor número de casos [61/115 (53 %)].

Tabla 1. Distribución de pacientes sospechosos de infección por dengue por grupo etario

Grupo etario	Número de Pacientes	%	Acumulado
0 hasta 24 meses	10	8.6	9.5
2 – 6 años	25	21,7	29.5
7 - 10 años	22	19,1	50.4
11 – 19 años	30	26	76.5
20 – 39 años	17	14,8	90.4
40 – 60 años	10	8,7	99.1
> 60 años	1	0,8 %	100
Total	115	100%	

5.3.2 Raza

Basados en las características fenotípicas, la mayoría de los pacientes participantes fueron mestizos [94,8 % (109/115)]. No se presentaron pacientes indígenas en el estudio (tabla 2).

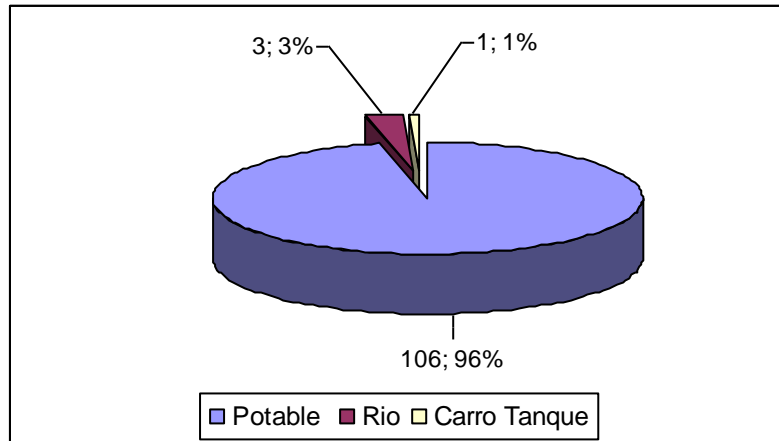
Tabla 2. Distribución de pacientes enrolados en el estudio por raza

RAZA	FRECUENCIA	%	ACUMULADO
Mestizo	109	94,8	94,8
Blanco	4	3,5	98,3
Negro	2	1,7	100
Total	115	100	

5.3.3 Abastecimiento de agua

Como un factor de riesgo que pudiera favorecer la presencia del mosquito vector del virus del dengue, se le preguntó a los pacientes por la fuente de agua en sus viviendas; la mayoría de ellos comentaron obtener agua del acueducto para consumo [106/115 (92,1 %)] (gráfica 3). Los pacientes provenientes de Palermo (Magdalena) documentaron que el Río Magdalena era la fuente de agua de consumo, almacenándola en tanques plásticos (figura 15).

Grafica 3. Formas de abastecimiento de agua para consumo en pacientes sospechosos para infecciones por el virus del dengue



**Figura 15. Tanques plásticos para almacenar agua ubicados en patio del domicilio
(Palermo – Magdalena)**



5.3.4 Ocupación del paciente

La mayoría de los pacientes sospechosos de infección tenían actividades que implicaban mayor tiempo de permanencia en el domicilio (estudiantes, pre-escolares y amas de casa) [86,2 % (99/115)](tabla 3). Un porcentaje menor correspondió a ocupaciones en donde la mayor estancia al día se ubicaba fuera del domicilio (profesores, auxiliar de eventos, vendedor ambulante, agricultor y médico) [5,3 % (6/115)].

Tabla 3. Ocupación de pacientes sospechosos de infecciones por dengue

OCUPACION	FRECUENCIA	%	ACUMULADO
Estudiante	64	55,7	55,7
Pre-escolar	18	15,7	71,4
Ama de casa	17	14,8	86,2
Oficios varios	4	3,5	89,7
Desempleado	3	2,6	92,3
Mercaderista	3	2,6	94,9
Profesor	2	1,7	96,6
Auxiliar de eventos	1	0,9	97,5
Vendedor ambulante	1	0,9	98,4
Agricultor	1	0,9	99,3
Médico	1	0,9	100
Total	115	100	

5.4 CLASIFICACIÓN DE CASOS DE FD Y DH EN SOSPECHOSOS Y PROBABLES

5.4.1 Casos sospechosos de FD

De los pacientes participantes en el estudio, el 92,1 % (106/115), reunieron criterios clínicos para ser clasificados como casos sospechosos de FD. El resto correspondieron a casos sospechosos de DH (tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de pacientes infectados por el virus del dengue en casos sospechosos de FD y DH con base en criterios de la OMS

DIAGNOSTICO SOSPECHOSO	FRECUENCIA	PORCENTAJE	ACUMULADO
Fiebre Dengue	106	92,1	92,1
Dengue Hemorrágico Grado I	1	0,8	92,9
Dengue Hemorrágico Grado II	5	4,3	97,2
Dengue Hemorrágico Grado III	3	2,6	100
Dengue Hemorrágico Grado IV	0	0	100
Total	115	100	

5.4.2 Casos probables de FD

El 39,6 % (42/106) de los pacientes clasificados como casos sospechosos de FD presentaron títulos positivos para IgM en una sola muestra serológica, definiéndose entonces como casos probables.

5.4.3 Casos probables de DH

Todos los pacientes con sospecha clínica de DH presentaron serologías positivas a partir de una sola muestra de suero para anticuerpos IgM anti-dengue mediante técnicas utilizadas en práctica asistencial (**PanBio Dengue Duo Cassette, Brisbane, Australia; UMELISA® Dengue IgM Plus**), clasificándose entonces como casos probables de DH.

La enfermedad se presentó de forma súbita en la mayoría de los pacientes con sospecha clínica de FD y DH (96,2 y 66,7 %, respectivamente); la prueba de torniquete positiva fue la manifestación hemorrágica de mayor ocurrencia en pacientes sospechosos y probables de FD (32,7 y 35,7 %, respectivamente).

El hematoma en venipunción y las petequias generalizadas fueron las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes sospechosos de DH (88,9 % para ambos) (figura 16). El dolor de cabeza fue el síntoma compartido más frecuente para pacientes probables de FD y DH (95,2 y 100 %, respectivamente) (tabla 5) (tabla 6).

Tabla 5. Características clínicas presentadas en pacientes sospechosos y probables de FD durante fase aguda de la enfermedad

CARACTERÍSTICA	SOSPECHOSO FD ¶	PROBABLE FD ¥
Presentación de la enfermedad		
Súbita	102/106 (96,2)	40/42 (95,2)
Insidiosa	4/106 (3,8)	2/42 (4,7)
Manifestaciones Hemorrágicas		
† Prueba de torniquete positiva	34/104 (32,7)	15/42 (35,7)
Petequias generalizadas	33/106 (31,1)	14/42 (33,3)
Hematoma en venipunción	7/106 (6,6)	5/42 (11,9)
Hemorragia gingival	4/106 (3,8)	3/42 (7,1)
Melena	4/106 (3,8)	2/42 (4,8)
Epistaxis	3/106 (2,8)	1/42 (2,4)
Hematemesis	2/106 (1,9)	1/42 (2,4)
Púrpura/Equimosis	1/106 (0,9)	1/42 (2,4)
Hematuria	1/106 (0,9)	1/42 (2,4)
Manifestaciones Clínicas Inespecíficas		
‡ Dolor de cabeza	71/83 (85,5)	32/35 (91,4)
Dolor Corporal / Irritabilidad	88/206 (83)	35/42 (83,3)
Escalofríos	78/106 (73,6)	32/42 (76,2)
‡ Dolor retro - ocular	57/83 (68,7)	27/35 (77,1)
‡ Náusea	44/83 (53)	18/35 (51,4)
Vomito	48/106 (45,3)	21/42 (50)
Tos	43/106 (40,6)	16/42 (38,1)
‡ Dolor de garganta	29/83 (34,9)	14/35 (40)
Congestión nasal	33/106 (31,1)	12/42 (28,6)
Erupción	26/106 (24,5)	13/42 (31)
Diarrea	15/106 (14,2)	6/42 (14,3)
Ictericia	1/106 (0,9)	15/42 (35,7)

¶ Número de pacientes con el hallazgo/ n (%) (n = 106)

¥ Número de pacientes con el hallazgo/ n (%) (n = 42)

† Se realizó prueba de torniquete a 104 pacientes (n = 104)

‡ Manifestación Clínica evaluada en pacientes mayores de 5 años (n = 83)

Figura 16. Hematoma en venipunción



Tablas 6. Características clínicas presentadas en pacientes con probable DH

CARACTERÍSTICA	FRECUENCIA	%
Presentación de la enfermedad		
Súbita	6/9	66,7
Insidiosa	3/9	33,3
Manifestaciones Hemorrágicas		
Prueba de torniquete positiva	6/9	66,7
Petequias generalizadas	8/9	88,9
Hematoma en venipunción	8/9	88,9
Hemorragia gingival	2/9	22,2
Melena	2/9	22,2
Epistaxis	-----	-----
Hematemesis	1/9	11,1
Púrpura/Equimosis	1/9	11,1
Hematuria	-----	-----
Manifestaciones Clínicas Inespecíficas		
‡ Dolor de cabeza	8/8	100
Dolor Corporal / Irritabilidad	9/9	100
Escalofríos	9/9	100
‡ Dolor retro - ocular	6/8	75
‡ Náusea	7/8	87,5
Vomito	7/9	77,8
Tos	3/9	33,3
‡ Dolor de garganta	4/8	50
Congestión nasal	3/9	33,3
Erupción	6/9	66,7
Diarrea	3/9	33,3
Ictericia	1/9	11,1

‡ Manifestación Clínica evaluada en pacientes mayores de 5 años (n = 8)

Una cantidad importante de casos sospechosos y probables de FD presentaron características para DH, sin reunir criterios completos para ser clasificados como tal. En pacientes sospechosos de FD se presentó trombocitopenia en un 12,7 % de los casos. La leucopenia estuvo presente en el 21,5 % siendo mas frecuente en aquellos casos con serologías positivas para IgM en muestra única de suero (40,4 %) (tabla 7).

Tabla 7. Caracterización de parámetros bioanalíticos en pacientes sospechosos y probables de FD

PARAMETRO	SOSPECHOSO n = 102		PROBABLE n = 42	
	Número de casos/n (%)	Media (DE)	Número de casos/n (%)	Media (DE)
† Trombocitopenia	13/102 (12,7)	67684 (30153)	7/42 (16,7)	75328 (24091)
‡ Leucopenia	22/102 (21,5)	3024 (736,4)	17/42 (40,4)	2978 (780,1)

† Conteo plaquetario $\leq 100,000/ \text{mm}^3$

‡ Conteo de leucocitos $< 4,000/ \text{mm}^3$

La trombocitopenia apareció en un rango de 3 a 7 días después de haber iniciado síntomas (Media = 5,57).

La leucopenia fue observable en los pacientes sospechosos de FD desde el día 0 hasta el día 5 después de haber iniciado los síntomas (Media = 2,59). En pacientes con infecciones probables este evento ocurrió desde el día 1 hasta el día 5 (Media = 3,05).

En pacientes con infección probable de DH este evento fue observable en un 66,6 % (6/9). Su aparición fue evidente desde el día 2 hasta el día 6 después de iniciado los síntomas (Media = 3,1).

5.5 CONFIRMACIÓN DE INFECCIONES EN PACIENTES SOSPECHOSOS

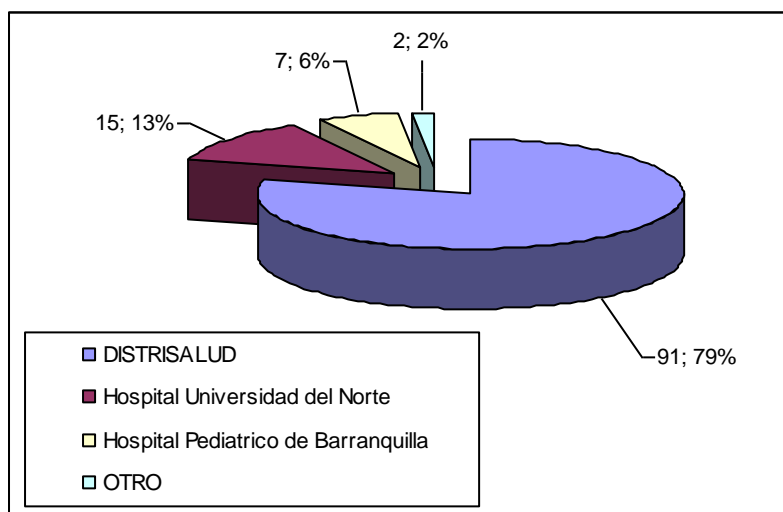
Previa firma de consentimiento informado se obtuvo el suero en fase aguda de 115 pacientes. La segunda muestra de suero (S2) se obtuvo del 88.3 % (102/115) (tabla 8).

Tabla 8. Distribución de muestras recolectadas en fase aguda con base en el día de recolección después de iniciado los síntomas

DÍA DE RECOLECCIÓN	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE	ACUMULADO
0	7	6	6
1	38	33	39,1
2	46	40	79,1
3	17	14,8	94
4	1	0,8	94,7
5	3	2,6	97,3
6	2	0,8	98,2
7	1	1,7	100
Total	115	100	

El método que obtuvo la mayor captación de pacientes febriles fue la búsqueda activa en sus domicilios, operada con la colaboración del Equipo de Vigilancia Epidemiológica de DISTRISALUD (gráfica 4).

Gráfica 4. Distribución de pacientes captados para el estudio según institución



El 80,4 % (33/41) de los casos confirmados correspondieron a infecciones secundarias y el 14,6 % (6/41) a infecciones primarias. Hubo 2 casos (4,6 %) confirmados mediante aislamiento viral que no reportaron incremento de títulos IgM/IgG (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución de pacientes con base en tipo de infección

METODO DE CONFIRMACION	No. DE PACIENTES	INTERVALO (DIAS) S1 - S2
<i>ELISA de captura IgM / IgG en muestras pareadas</i>		
Primaria	5 (12,1)	2 - 9
Secundaria	31 (75,6)	2 - 10
<i>ELISA de captura IgM / IgG en muestra única †</i>		DIA DE RECOLECCION S1
Primaria	1 (2,38)	1
Secundaria	2 (4,76)	1 - 2
Total confirmadas	39	

† Tipo de respuesta inmune clasificado con base en radios de DO (IFalconar, nnis, Kuno, Shu) aplicados a la primera muestra de suero.

En 13 pacientes no se pudo confirmar la infección mediante titulación de anticuerpos porque fue imposible recolectar una segunda muestra. De estos, fue posible confirmar la infección en 5 pacientes mediante aislamiento viral (procedimiento realizado por el Dr Andrew Falconar). Una vez aislado el virus, se clasificaron las infecciones en primarias y secundarias mediante radios de densidad óptica (Falconar, Innis, Kuno y Shu) a una dilución 1/100 del único espécimen recolectado dentro de los dos primeros días de la enfermedad (S1)(tabla 10).

Tabla 10. Títulos que permitieron agrupar los pacientes en infecciones primarias y secundarias en muestras pareadas de suero mediante ELISA de captura IgM/IgG

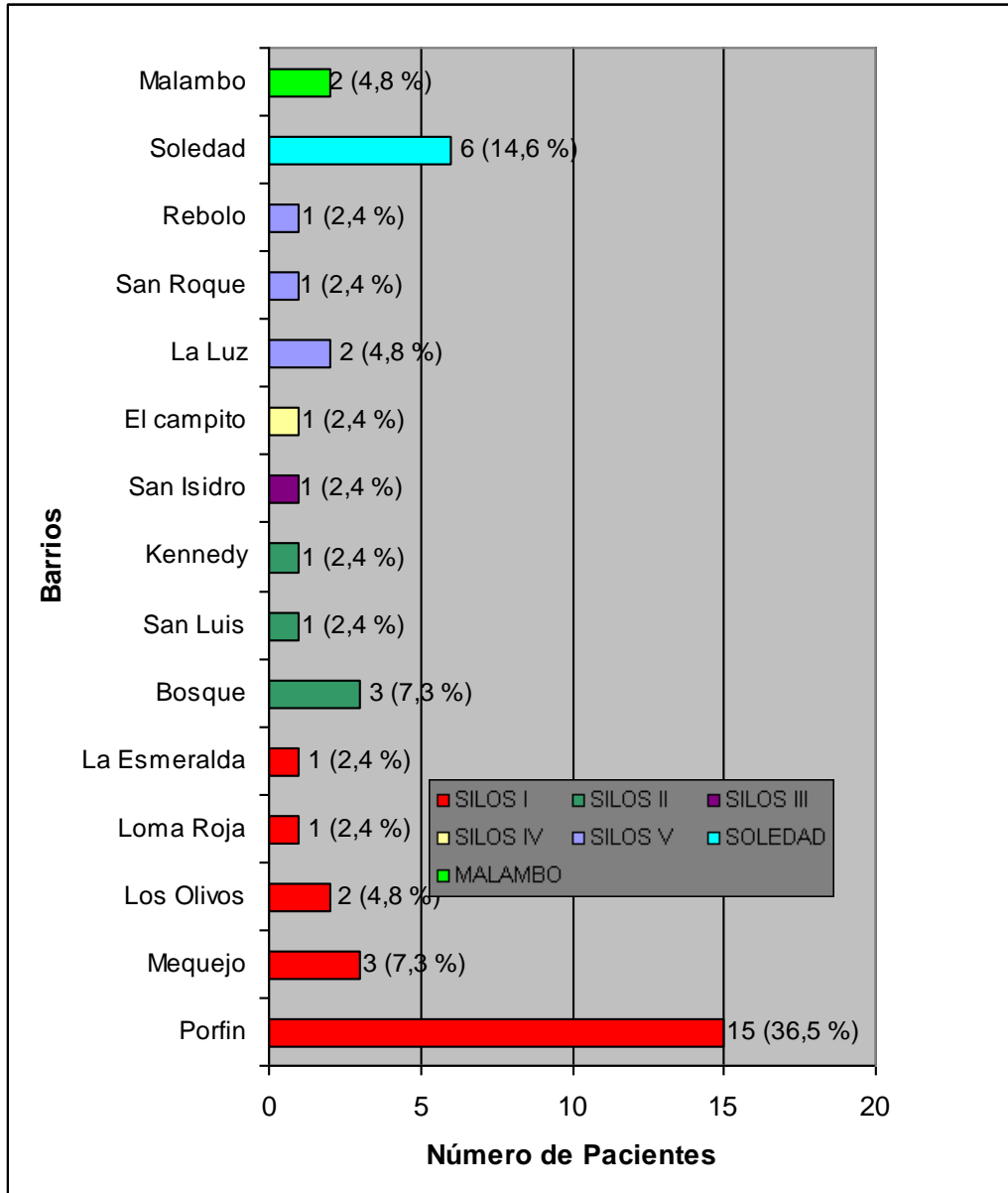
TIPO DE INFECCIÓN	NUMERO DE PACIENTES	PRIMERA MUESTRA		SEGUNDA MUESTRA	
		RANGO DE TITULOS		RANGO DE TITULOS	
PRIMARIA		IgM	IgG	IgM	IgG
Día 0	0	0	0	0	0
Día 1	2	0	0	2,26 - 2,92	0
Día 2	3	0	0	2,62 - 3,2	0
Día 3	0	0	0	0	0
Día 7	0	0	0	0	0
SECUNDARIAS					
Día 0	2	0 - 3,46	0 - 4,98	3,52 - 3,98	5,56 - 6,02
Día 1	5	0 - 3,18	0 - 4,28	2,26 - 4,05	5,38 - 6,56
Día 2	14	0	0 - 4,97	0 - 4,6	4,86 - 6,74
Día 3	9	0 - 3,5	0 - 5,34	0 - 3,74	4,46 - 6,8
Día 7	1	4,66	2,3	3,74	4,46
TOTAL	36				

El 13 % (15/115) de los pacientes estudiados presentaron títulos de anticuerpos IgM y/o IgG sin aumento cuádruplo entre primera y segunda muestra. Estos pacientes se catalogaron como infecciones recientes por flavivirus.

5.5.1. Distribución y área de estudio de pacientes confirmados

Se confirmó infección por el virus del dengue en el 35,6 % (41/115) de los casos sospechosos. La mayor ocurrencia de casos confirmados se encontró en el barrio Porfín [36,5 % (15/41)], ubicado en los SILOS I y en el municipio de Soledad [14,6 % (6/41)] (gráfica 5), con un caso por cada barrio (Hipodromo, Santa Inés, Ciudadela Metropolitana, Las Moras, La Floresta y La Esperanza).

Grafica 5. Distribución de pacientes confirmados en las diferentes áreas de estudio

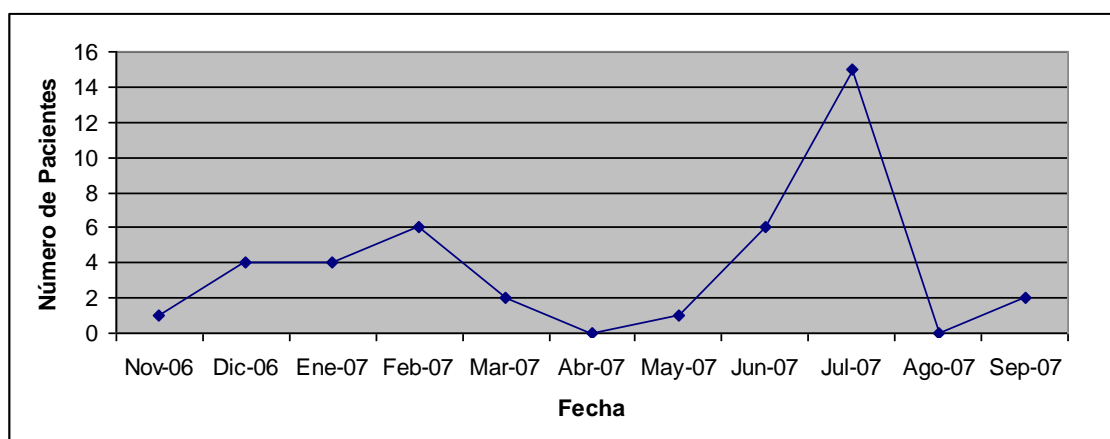


En Malambo, 2 casos fueron confirmados. Estos correspondieron a los barrios El Concord y San Martín.

5.5.2 Distribución de casos confirmados en el tiempo de recolección

La mayor positividad de casos se encontró durante el periodo correspondiente a junio – julio del año 2007 [51,2 % (21/41)] (gráfica 6). Durante este periodo se presentó un brote epidémico de FD en el barrio Porfín. Este obtuvo la mayor positividad para casos confirmados.

Gráfica 6. Distribución de pacientes confirmados por infecciones del virus del dengue según la fecha de notificación de caso



5.5.3 Aspectos socio-demográficos en pacientes confirmados

La población mas afectada fue la de los estudiantes menores de 12 años ($p < 0.05$)(tabla 11).

Tabla 11. Asociación entre pacientes infectados con el virus del dengue y aspectos sociodemográficos

ASPECTO SOCIO DEMOGRAFICO	DENGUE n = 39	NO DENGUE n = 74	TOTAL n = 113	OR (IC 95 %)	p
SEXO	no (%)	no (%)	no (%)		
Femenino	22 (56,5)	38 (24,3)	60 (53,1)	1,23 (0,52 - 2,88)	0,753
Masculino	17 (43,5)	36 (48,6)	53 (46,9)		
RAZA					
Mestizo	38 (97,4)	69 (93,2)	107 (94,6)	2,75 (0,29 - 133,6)	0,66
Blanco	0	4 (5,4)	4 (3,47)	-----	-----
Negro	1 (2,6)	1 (1,35)	2 (1,76)	1,92 (0,02 - 152,8)	1
EDAD					
≤ 12 años	32 (82)	9 (12,1)	41 (36,3)	33 (10,13 - 114,46)	< 0,0001
> 12 años	7 (18)	65 (87,8)	72 (63,7)		
OCUPACION					
Estudiante	30 (76,9)	33 (44,6)	63 (55,8)	4,14 (1,60 - 10,96)	0,002
Pre - escolar	5 (12,8)	12 (16,2)	17 (15)	0,76 (0,19 - 2,57)	0,83
Ama de casa	3 (7,74)	14 (18,9)	17 (15)	0,36 (0,06 - 1,42)	0,19
Independiente	1 (2,56)	3 (4)	4 (3,5)	0,62 (0,01 - 8,09)	1
Mercaderista	0	3 (4)	3 (2,6)	-----	-----
Desempleado	0	3 (4)	3 (2,6)	-----	-----
Profesor	0	2 (2,7)	2 (1,8)	-----	-----
Vendedor ambulante	0	1 (1,35)	1 (0,9)	-----	-----
Agricultor	0	1 (1,35)	1 (0,9)	-----	-----
Auxiliar de eventos	0	1 (1,35)	1 (0,9)	-----	-----
Médico	0	1 (1,35)	1 (0,9)	-----	-----

5.6 CONFIRMACION DE DIAGNOSTICO CLINICO Y CARACTERIZACION DE MANIFESTACIONES CLINICAS

Se confirmó el diagnóstico clínico de FD en el 31,3 % (33/106) de los casos sospechosos y en el 78,5 % (33/42) de los casos probables. El diagnóstico clínico de DH fue confirmado en el 66,6 % (6/9) de los casos probables, siendo sus estadios leves (Grado I y II) las formas mas frecuentes de presentación en

el estudio (tabla 12). La ocurrencia de FD y DH en la población general estudiada fue del 28,6 % (33/115) y 5,21 % (6/115), respectivamente.

Tabla 12. Distribución de la severidad del dengue hemorrágico

DIAGNOSTICO CONFIRMADO	FRECUENCIA	%	ACUMULADO
Dengue Hemorrágico Grado I	1	16,6	16,6
Dengue Hemorrágico Grado II	3	50	66,6
Dengue Hemorrágico Grado III	2	33,3	100
Total	6	100	

La prueba de torniquete positiva fue el hallazgo más común en los pacientes con infecciones por el virus del dengue. El dolor de cabeza y el dolor corporal (irritabilidad) se mostraron como las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con infecciones confirmadas. Se encontró asociación estadística entre la aparición de hematoma en venipunción e infección confirmada por el virus (tabla 13).

Tabla 13. Características clínicas en pacientes confirmados por infecciones del virus del dengue

CARACTERÍSTICA	DENGUE	NO DENGUE	OR (IC 95%)	p
Presentación de la enfermedad No. (%)	n = 39	n = 74		
Súbita	36 (92,3)	70 (94,6)	0,69 (0,11 - 4,95)	0,69
Insidiosa	3 (7,7)	4 (94,6)		
Manifestaciones Hemorrágicas No. (%)				
Prueba de torniquete positiva	19 (48,7)	21 (28,3)	2,40 (0,99 - 5,82)	0,052
Petequias generalizadas	18 (46,1)	23 (31)	1,90 (0,79 - 4,57)	0,168
Hematoma en venipunción	9 (23)	6 (8,1)	3,40 (0,97 - 12,58)	0,026
Hemorragia gingival	3 (7,7)	3 (4)	1,97 (0,25 - 15,38)	0,413
Melena	2 (5,12)	4 (5,4)	0,95 (0,08 - 6,96)	1
Hematemesis	2 (5,12)	1 (1,35)	3,95 (0,20 - 235,91)	0,27
Púrpura/Equimosis	1 (2,56)	1 (1,35)	1,92 (0,02 - 152,83)	1
Epistaxis	0	3 (4,05)	0 - 4,59	0,55
Hematuria	0	1 (3,5)	0 - 74	1
Manifestaciones Clínicas No. (%)				
‡ Dolor de cabeza	31 (93,9)	48 (82,8)	3,23	0,19
Dolor Corporal / Irritabilidad	35 (85,4)	62 (83,8)	1,13	0,82
Escalofríos	34 (82,9)	53 (71,6)	1,92	0,17
‡ Dolor retro - ocular	26 (78,8)	37 (63,8)	2,11	0,13
‡ Náusea	20 (60,6)	31 (53,4)	1,34	0,51
Vomito	22 (53,7)	33 (44,6)	1,44	0,35
Tos	14 (34,1)	32 (43,2)	0,68	0,34
‡ Dolor de garganta	12 (36,4)	21 (36,2)	1,01	0,98
Congestión nasal	13 (31,7)	23 (31,1)	1,03	0,94
Erupción	13 (31,7)	16 (21,6)	1,68	0,23
Diarrea	5 (12,2)	13 (17,6)	0,65	0,44
Ictericia	0	2 (3,4)	0	0,53

‡ Manifestaciones clínicas evaluadas en pacientes mayores de 5 años (dengue: n=33; no dengue: n=58)

Hubo asociación estadística entre las infecciones por dengue y un conteo leucocitario en fase aguda menor de 4000/mm³ ($p < 0,05$). La media de los días en que se tomó el hemograma para la evaluación del conteo leucocitario, luego de iniciados los síntomas, fue de 2,94 días.

Solo fué posible evaluar la hemoconcentración en pacientes con dos o mas hemogramas (n = 94) (tabla 14).

Tabla 14. Caracterización de parámetros bianalíticos en pacientes con infecciones confirmadas por el virus del dengue

PARAMETRO	DENGUE	NO DENGUE	OR (IC 95 %)	p
	n = 39	n = 70		
	Número de casos / (%)	Número de casos / (%)		
† Leucopenia	18 (46,1)	10 (14,3)	5,14 (1,88 - 14,35)	0,00062
‡ Trombocitopenia	12 (30,8)	9 (12,8)	3,01 (1,03 - 8,94)	0,0434
	n = 34	n = 60		
¥ Hemoconcentración	6 (17,6)	3 (4,3)	4,07 (0,79 - 26,6)	0,0671

† Leucopenia definida como leucocitos < 4000 / mm³

‡ Trombocitopenia definida como plaquetas ≤ 100.000 /mm³

¥ Hematocrito aumentado o disminuido ≥ 20 % en hemogramas consecutivos

La prueba de torniquete positiva y las petequias generalizadas fueron los hallazgos mas frecuentes encontrados en pacientes con FD y DH. Las manifestaciones hemorrágicas tuvieron menos ocurrencia en pacientes con FD (tabla 15).

Tabla 15. Caracterización clínica de pacientes con diagnósticos confirmados de FD/DH

CARACTERISTICA	FD	DH	OR (IC 95 %)	p
Presentación de la enfermedad No. (%)	n = 33	n = 6		
Súbita	32 (97)	4 (66,7)	16 (0,61 - 971,62)	0,056
Insidiosa	1 (3)	2 (33,3)		
Manifestaciones Hemorrágicas No. (%)				
Prueba de torniquete positiva	13 (39,3)	6 (100)	0 (0 - 0,68)	0,008
Petequias generalizadas	12 (36,3)	6 (100)	0 (0 - 0,60)	0,005
Hematoma en venipunción	4 (12,1)	5 (83,3)	0,03 (0 - 0,38)	0,001
Hemorragia gingival	2 (6)	1 (16,7)	0,32 (0,9 - 22,8)	0,402
Melena	1 (3)	1 (16,7)	0,16 (0 - 14,7)	0,287
Hematemesis	1 (3)	1 (16,7)	0,16 (0 - 14,7)	0,287
Púrpura/Equimosis	0	1 (16,7)	0 (0 - 7,09)	0,153
Epistaxis	0	0	*****	*****
Hematuria	0	0	*****	*****
Manifestaciones Clínicas No. (%)				
‡ Dolor de cabeza	23 (82,1)	5 (100)	0 (0 - 6,89)	0,568
Dolor Corporal / Irritabilidad	25 (75,7)	5 (83,3)	0,63 (0,01 - 7,02)	1
Escalofríos	26 (78,7)	6 (100)	0 (0 - 4,06)	0,567
‡ Dolor retro - ocular	22 (78,6)	4 (80)	0,92 (0,02 - 11,9)	1
‡ Náusea	16 (57,1)	4 (80)	0,33 (0,01 - 4,09)	0,625
Vomito	16 (57,1)	5 (83,3)	0,19 (0 - 2,03)	0,189
Tos	10 (30,3)	3 (50)	0,43 (0,05 - 3,91)	0,38
‡ Dolor de garganta	10 (35,7)	2 (40)	0,83 (0,08 - 11,62)	1
Congestión nasal	8 (24,2)	3 (33,3)	0,32 (0,04 - 2,97)	0,323
Erupción	10 (30,3)	3 (50)	0,43 (0,05 - 3,91)	0,38
Diarrea	3 (9,1)	2 (33,3)	0,20 (0,02 - 3,26)	0,161
Ictericia	0	0	*****	*****

‡ Manifestaciones clínicas evaluadas en pacientes mayores de 5 años (FD: n = 28; DH: n = 5)

5.6.1 Hospitalizaciones

El 13,9 % (16/115) de los pacientes sospechosos requirieron hospitalización. De estos, solo el 62,5 % (10/16) tuvieron infección confirmada por dengue, clasificándose entonces en FD y DH para el 40 % (4/10) y el 60 % (6/10) de los hospitalizados confirmados, respectivamente.

Se encontró que el 83,3 % (5/6) de los pacientes hospitalizados cuyas infecciones no fueron demostrables, presentaron títulos positivos de anticuerpos IgM/IgG para dengue. Estos no mostraron aumento cuádruplo en muestras pareadas, por lo tanto, se clasificaron como infecciones recientes por flavivirus. El cuadro clínico de estos pacientes no fue atribuible a infecciones por el virus del dengue. Dos pacientes con infecciones recientes secundarias tuvieron como diagnóstico de egreso malaria por *P. vivax* (tabla 16).

Tabla 16. Caracterización diagnóstica de pacientes que requirieron hospitalización

No.	SOSPECHA CLINICA	DIAGNOSTICO SEROLOGICO	DIAGNOSTICO CONFIRMADO
1	Dengue Hemorrágico	Infección reciente por flavivirus	Malaria por <i>P. vivax</i>
2	Dengue Hemorrágico	Infección reciente por flavivirus	Malaria por <i>P. vivax</i>
3	Fiebre Dengue	Negativo	?????
4	Fiebre Dengue	Infección reciente por flavivirus	?????
5	Fiebre Dengue	Infección reciente por flavivirus	?????
6	Dengue Hemorrágico	Infección reciente por flavivirus	?????

Un paciente sospechoso de FD (caso número 3) presentó fiebre de inicio súbito en su estancia hospitalaria (40 °C), mialgias, artralgias, y manifestaciones hemorrágicas (melena y hematoma en venipunción) asociado a leucopenia y trombocitopenia. La ELISA de captura no registró títulos de anticuerpos IgM/IgG para dengue, por lo cuál se descartó infección.

5.7 TIPO DE INFECCIÓN (RESPUESTA INMUNE) Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

Todos los pacientes confirmados de los cuales fue posible determinar el tipo de respuesta inmune (39 pacientes) presentaron inicio súbito de síntomas (tabla 19); de estos el 84,6% (33/39) fueron diagnosticados con FD. El 18,8% (6/33) presentaron infecciones primarias y el 81,8% (27/33) presentaron infecciones secundarias. Todos los pacientes con DH presentaron infecciones secundarias [100 % (6/6)].

Dentro de las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con infección primaria encontramos dolor corporal e irritabilidad [100 % (6/6)]; escalofríos [83,3 % (5/6)] y dolor de cabeza [50 % (3/6)]. Las manifestaciones clínicas en infecciones secundarias fueron dolor de cabeza y dolor corporal e irritabilidad [84,8 % (28/33)] y dolor retro – ocular [84,8 % (28/33)].

El 66,6% (4/6) de los pacientes con infecciones primarias presentaron prueba de torniquete positiva como la principal manifestación hemorrágica. Le siguió el hematoma en venipunción [16,6 % (1/6)]. La prueba de torniquete positiva [48,4 % (16/33)], las petequias generalizadas (16/33) y el hematoma en venipunción [45,4 (15/33)] fueron las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes en infecciones secundarias (tabla 17).

Tabla 17. Características clínicas en pacientes confirmados distribuidos con base en el tipo de infección (primaria o secundaria)

CARACTERÍSTICA	PRIMARIA	SECUNDARIA	OR	IC 95 %	p
Presentación de la enfermedad No. (%)	n = 6	n = 33			
Súbita	6 (100)	30 (90,9)	***	*****	1
Insidiosa	0 (0)	3 (9,1)			
Manifestaciones Hemorrágicas No. (%)					
Prueba de torniquete positiva	3 (50)	16 (48,5)	1,06	0,12 - 9,13	1
Petequias generalizadas	0 (0)	15 (45,5)	1,2	0,14 - 10,2	1
Hematoma en venipunción	1 (16,7)	8 (24,2)	0,6	0,01 - 7,02	1
Hemorragia gingival	0 (0)	3 (9,1)	0	0 - 14,56	1
Melena	0 (0)	2 (6,1)	0	0 - 31,3	1
Hematemesis	0 (0)	2 (6,1)	0	0 - 31,0	1
Púrpura/Equimosis	0 (0)	1 (3)	0	0 - 2,4	1
Manifestaciones Clínicas No. (%)					
‡ Dolor de cabeza	3 (75)	28 (96,6)	0,11	0 - 11,19	0,2
Dolor Corporal / Irritabilidad	6 (100)	28 (84,8)	****	*****	0,5
Escalofríos	5 (83,3)	27 (81,8)	0,09	1,11 - 61,2	1
‡ Dolor retro - ocular	2 (50)	24 (82,8)	0,21	0,01 - 3,73	0,18
‡ Náusea	1 (25)	19 (65,5)	0,18	0 - 2,65	0,27
Vomito	2 (33,3)	19 (57,6)	0,37	0,03 - 3,07	0,38
Tos	1 (16,7)	12 (36,4)	0,47	0,01 - 6,88	1
‡ Dolor de garganta	2 (50)	10 (34,5)	2,3	0,14 - 35,11	0,58
Congestión nasal	1 (16,7)	10 (30,3)	0,46	0,01 - 5,03	0,65
Erupción	1 (16,7)	12 (36,4)	0,35	0,01 - 3,78	0,64
Diarrea	1 (16,7)	4 (12,1)	1,45	0,02 - 19,42	1

‡ Manifestaciones clínicas evaluadas en pacientes mayores de 5 años (primaria: n=4; no dengue: n=29)

No se encontró asociación estadística entre un tipo de infección (primaria o secundaria) y la presencia de leucopenia o trombocitopenia (tabla 18). La leucopenia se evidenció en el mismo porcentaje [33,33% (2/6)] tanto en infecciones primarias (media = 2,195 /mm³) como en infecciones secundarias

[33,33% (11/33)] (media = 3,220 /mm³) (Tabla 20). Estos hallazgos fueron evidentes desde el día 2 hasta el día 5 después de iniciado los síntomas (media = 3,15).

Tabla 18. Caracterización de parámetros bioanalíticos en pacientes con infecciones primarias y secundarias

PARAMETRO	PRIMARIA	SECUNDARIA	OR	IC	p
	n = 6	n = 33			
	Número de casos / (%)	Número de casos / (%)			
† Leucopenia	2 (33,3)	11 (33,3)	1,27	0,10 - 10,4	1
‡ Trombocitopenia	0	12 (36,3)	0	0 - 1,80	0,1508
¥ Hemoconcentración	0	6 (18,1)	4,07	0,79 - 26,5	0,0671

† Leucopenia definida como leucocitos < 4000 / mm³

‡ Trombocitopenia definida como plaquetas ≤ 100.000 /mm³

¥ Hematocrito aumentado o disminuido ≥ 20 % en hemogramas consecutivos

La trombocitopenia (media = 64,275 /mm³) fue reportada desde el día 2 hasta el día 8 después de iniciado los síntomas (media = 4,25) solamente en pacientes con infecciones secundarias 12/33 al igual que la hemoconcentración (6/33) (tabla 15). El 50 % (6/12) de los pacientes con trombocitopenia presentaron FD.

Un caso de DH confirmado se presentó en una lactante de 3 meses de edad. La paciente cursó con derrame pleural, ascitis, hepatomegalia y congestión nasal. La respuesta inmune registrada fue de tipo secundario. Una muestra única de suero fue tomada a su madre asintomática, revelando la presencia de anticuerpos IgM e IgG.

5.8 EVALUACION DE LA PRUEBA DE TORNIQUETE

Fue posible evaluar la prueba de torniquete en 113 pacientes. El 46,3 % (19/41) de los casos confirmados presentaron prueba de torniquete positiva, incluyendo todos los casos de DH [100 % (6/6)]. En pacientes con FD la positividad de la prueba fue del 37,1 % (13/35). El 29,1 % (21/72) de los pacientes con síndromes febriles no dengue también presentaron positividad en la prueba (tabla 19).

Tabla 19. Distribución de pacientes con prueba de torniquete positiva en la población estudiada

PRUEBA DE TORNIQUETE	DENGUE	No. DE PETEQUIAS	NO DENGUE	No. DE PETEQUIAS
	n = 39	Media	n = 72	Media
POSITIVA No. (%)	19 (48,7)	34,7	21 (29,1)	35,9
NEGATIVA No. (%)	22 (51,3)	0,57	51 (70,8)	0
TOTAL	39		72	

La prueba presentó mayor especificidad (70,8 %) que sensibilidad (46,3 %) en pacientes con infecciones confirmadas, sin embargo, al evaluarla teniendo en cuenta el tipo de presentación clínica (FD o DH), la prueba fue positiva en todos los pacientes con DH (tabla 20).

Tabla 20. Distribución de la prueba de torniquete entre las diferentes formas clínicas

PRUEBA DE TORNIQUETE	DH	No. DE PETEQUIAS	FD	No. DE PETEQUIAS
	n = 6	Media	n = 33	Media
POSITIVA No.(%)	6 (100)	33	13 (39,4)	36,6
NEGATIVA No. (%)	0	0	20 (60,6)	0,54

En cuanto al número de petequias, el punto de corte que presentó mayor sensibilidad (48,7 %) fue aquel que se tomó a un valor igual o mayor de 10 petequias (tabla 21).

Tabla 21. Especificidad y sensibilidad de la prueba de torniquete con base en el número de petequias

NUMERO DE PETEQUIAS	DENGUE n = 41	NO DENGUE n = 72	ESPECIFICIDAD %	SENSIBILIDAD %
≥ 10	20	22	69,4	48,7
≥ 20	19	22	72,2	40,3
≥ 30	14	14	80	34,1
≥ 40	7	6	91,6	17
≥ 50	1	3	95,8	2,43
≥ 60	0	2	97,2	*****

5.9 EVALUACIÓN DE RADIOS DE DENSIDAD ÓPTICA

Fue posible evaluar los puntos de corte que clasificaran el tipo de respuesta inmune en 35 pacientes confirmados por incremento cuádruplo de títulos IgM o IgG (OMS, 1997). Un paciente cuyo tipo de infección fue secundario se descartó en la evaluación al corresponder su muestra S1 a fase aguda tardía (sexto día).

Los puntos de corte propuestos por Falconar e Innis clasificaron obtuvieron un mayor porcentaje de efectividad al clasificar el tipo de respuesta inmune [85,7 % (30/35) y 82,85 % (29/35), respectivamente] en sueros de fase aguda a una dilución 1/100. Los puntos de corte propuestos por Kuno y Shu obtuvieron un porcentaje de efectividad menor [68,5 % (24/35) y 65,7 (23/35) respectivamente) (Tabla 22).

Tabla 22. Radios de densidad óptica de sueros pareados (dilución 1/100)

a Día	Suero 1 b		Radio DO IgM/IgG	c F/I/K/S	Suero 2 b		Radio DO IgM/IgG	d I/K/S	e OMS
	Título (DO a 1/100) IgM	IgG			Título (DO a 1/100) IgM	IgG			
0	----- (0,42)	----- (0,69)	0,60	S	3,52 (1,50)	5,56 (1,80)	0,83	S	S
0	3,46 (1,43)	4,98 (1,16)	1,23	S/S/S/P	3,98 (1,59)	6,02 (1,59)	1	S	S
1	----- (0,21)	4,18 (0,83)	0,25	S	4,05 (1,23)	6,56 (1,36)	0,90	S	S
1	----- (0,48)	----- (0,27)	1,77	S/S/P/P	3,18 (1,30)	5,55 (1,46)	0,89	S	S
1	----- (0,36)	----- (0,24)	1,5	S/P/P/P	3,28 (1,46)	6,60 (1,84)	0,79	S	S
1	----- (0,26)	----- (0,70)	0,37	S	2,26 (0,99)	----- (0,32)	3,09	P	P
1	3,18 (1,30)	----- (0,31)	4,19	P	3,22 (1,44)	5,38 (1,39)	1,03	S	S
1	----- (0,55)	4,28 (0,88)	0,63	S	3,40 (1,04)	6,28 (1,41)	0,74	S	S
1	----- (0,69)	----- (0,23)	3	P	2,92 (1,25)	----- (0,26)	4,80	P	P
2	----- (0,40)	4,18 (0,83)	0,48	S	2,90 (1,03)	5,71 (1,37)	0,76	S	S
2	----- (0,24)	----- (1,04)	0,23	S	3,09 (1,04)	6,74 (1,34)	0,78	S	S
2	----- (0,61)	4,62 (1,02)	0,59	S	----- (1,30)	6,12 (1,80)	0,72	S	S
2	----- (0,29)	----- (0,13)	2,23	S/P/P/P	2,62 (1,13)	----- (0,44)	2,56	P	P
2	----- (0,34)	----- (0,23)	1,47	S/S/P/P	----- (0,80)	5,22 (1,64)	0,48	S	S
2	----- (0,28)	4,66 (1,06)	0,26	S	----- (0,56)	6,34 (1,85)	0,30	S	S
2	----- (0,30)	----- (0,10)	3	P	3,68 (1,54)	4,86 (1,38)	1,11	S	S
2	----- (0,46)	----- (0,14)	3,28	P	----- (0,84)	----- (0,51)	1,64	S/P/P	P
2	----- (0,85)	4,46 (0,92)	0,92	S	2,92 (1,20)	6 (1,57)	0,76	S	S
2	----- (0,51)	----- (0,31)	1,64	S/S/P/P	4,6 (1,10)	3,46 (1,19)	0,92	S	S
2	----- (0,71)	----- (0,25)	2,84	P	3,20 (0,98)	----- (0,45)	2,17	P	P
2	----- (0,30)	4,97 (1,19)	0,25	S	3,93 (1,30)	5,83 (1,38)	0,94	S	S
2	----- (0,33)	----- (0,13)	2,53	S/P/P/P	3,24 (1,36)	4,86 (1,33)	1,02	S	S
2	----- (0,40)	----- (0,15)	2,66	P/S/S/S	3,62 (1,58)	5,66 (1,54)	1,02	S	S
2	----- (0,75)	----- (0,35)	2,14	S/P/P/P	3,60 (1,67)	6,60 (1,65)	1,01	S	S
2	----- (0,21)	----- (0,40)	0,52	S	----- (0,58)	----- (1,58)	0,36	S	S
2	----- (0,49)	----- (0,28)	1,75	S/S/P/P	3,48 (1,60)	5,62 (1,59)	1	S	S
3	----- (0,67)	4,50 (1,03)	0,65	S	3,52 (1,28)	6,22 (1,67)	0,76	S	S
3	2,82 (1,04)	----- (0,61)	1,70	S/S/P/P	3,72 (1,34)	5,90 (1,63)	0,82	S	S
3	----- (0,38)	----- (0,59)	0,64	S	----- (0,74)	6,80 (1,88)	0,39	S	S
3	----- (0,33)	----- (0,45)	0,73	S	----- (0,51)	5,90 (1,48)	0,34	S	S
3	----- (0,39)	----- (0,85)	0,45	S	2,26 (0,93)	6,12 (1,44)	0,64	S	S
3	3,50 (1,59)	5,34 (1,58)	1	S	3,86 (1,73)	6,22 (1,64)	1,05	S	S
3	----- (0,59)	----- (0,73)	0,80	S	3,64 (1,87)	5,30 (1,57)	1,19	S	S
3	1,66 (0,92)	4,62 (1,21)	0,76	S	3,02 (1,48)	5,90 (1,60)	0,92	S	S
3	----- (0,51)	----- (0,61)	0,83	S	3,00 (1,09)	6,48 (1,39)	0,78	S	S

^a Día en que se recolectó la muestra luego de iniciado los síntomas.

^b $\log_{10}t_{50}$ de los títulos de IgM e IgG. ---- indica títulos por debajo del umbral de densidad óptica (densidad óptica < 0,87). Los radios de densidad óptica para IgM e IgG a una dilución de los sueros en 1/100, se encuentran en paréntesis ().

^c Clasificación del tipo de respuesta inmune en primaria (P) (Falconar \geq 2,60; Innis \geq 1,78; Kuno \geq 1,40; Shu \geq 1,20) o secundaria (S) (Falconar \leq 2,60; Innis 1,78; Kuno \geq 1,40; Shu \leq

1,20) usando los puntos de corte para radios de densidad óptica IgM/IgG en las muestras de suero en fase aguda (S1).

^d Clasificación del tipo de respuesta inmune en primaria (P) (Innis $\geq 1,78$; Kuno $\geq 1,40$; Shu $\geq 1,20$) o secundaria (S) (Innis $\leq 1,78$; Kuno $\leq 1,40$; Shu $\leq 1,20$) usando los puntos de corte para radios de densidad óptica IgM/IgG en las muestras de suero en fase convaleciente (S2) .

^e Clasificación del tipo de respuesta inmune en primaria (P) o secundaria (S) mediante el incremento igual o mayor a 4 veces, de los títulos IgM (P) o IgG (S) en muestras pareadas de suero (parámetro de la OMS).

6. DISCUSIÓN

6.1 Características socio-demográficas

Las características socio-demográficas de la población reflejan los posibles factores de riesgo para el desarrollo de la transmisión vectorial de la enfermedad. La población estudiada correspondió en su mayoría a niños, adolescentes y adultos jóvenes sintomáticos (principalmente amas de casa) quienes pasan gran parte del tiempo en sus domicilios.

El factor edad es importante considerando que las formas graves de la enfermedad (DH/SSD) tienen mayor incidencia de (DH) en menores de 15 años (162).

Durante el periodo de estudio se encontró la mayor cantidad de casos durante los meses de junio – julio de 2007, provenientes en su mayoría de SILOS I (Los Olivos y barrios circunscritos) en donde existen prácticas de almacenamiento de agua en recipientes de gran volumen (albercas, tanques). Este hábito, asociado a la ventaja que para la población representa (“no se desperdicia el agua con la llave abierta y por ende se ahorra dinero”) (163)

162. World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines. WHO Regional publication, SEARO, No 29, 1999.

163. Ognan C. MSc Thesis (2007) An evaluation of different intervention methods against the immature stages of *Aedes aegypti* in the Atlántico Department, Colombia. London School of Hygiene and Tropical Medicine

constituye un factor de riesgo epidemiológico importante. Estos depósitos han sido determinados como los productores de un mayor número de mosquitos, comparados con otros sitios de cría, de acuerdo a estudios entomológicos realizados en la Ciudad de Barranquilla, y que incluyen barrios del SILOS I (164, 165).

6.2 Clasificación de casos en FD y DH

Los criterios diagnósticos para el reconocimiento de casos están dados a nivel mundial por la OMS. El adecuado manejo de estos criterios permite diferenciar entre FD y DH (este último con sus cuatros estadios). Solo obtendremos prevalencias reales de FD/DH si se emplean correctamente las herramientas diagnósticas que tenemos a la mano.

Se puede observar que al aplicar los criterios en la población estudiada, la ocurrencia de casos sospechosos de DH es baja [7,82 % (9/115)]. Es importante describir que todos los casos cuya sospecha clínica fue categorizada como DH presentaron títulos positivos para anticuerpos IgM – anti dengue.

164. Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK. **2006**, Pupal productivity surveys to identify the key containers habitats of *Aedes aegypti* (L) in Barranquilla the principal sea port of Colombia Ann Trop Med Parasitol. 2006 Apr;100 Suppl 1:S87-S95

165. Romero-Vivas CM, Llinás H, Falconar AK. Three calibration factors, applied to a rapid sweeping method, can accurately estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) pupal numbers in large water-storage containers at all temperatures at which dengue virus transmission occurs. J Med Entomol. 2007 Nov;44(6):930-7

Los criterios de la OMS aplicados estrictamente pudieron clasificar una sospecha clínica en un caso probable, siendo estos diagnósticos de gran importancia en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad e imprescindibles para el adecuado abordaje terapéutico del paciente. La clasificación clínica de casos se realizó empleando las antiguas guías propuesta por la OMS (fiebre dengue y dengue hemorrágico en sus cuatro estadios)(166) dado a que permiten una clasificación más discreta de los casos presentados en Barranquilla y área metropolitana.

Hay un porcentaje importante de pacientes que presentaron manifestaciones hemorrágicas sin DH. Es importante para el clínico entender que las manifestaciones hemorrágicas no implican en un paciente la presencia de DH. Un paciente puede fallecer por FD, sin entrar a DH. La ocurrencia de este evento es muy baja (< 1 %) (166).

La prueba de torniquete positiva se evidenció como la manifestación hemorrágica mas frecuente en pacientes sospechosos y probables de FD. En el sur este asiático se ha demostrado en poblaciones de todas las edades que una prueba de torniquete positiva no es un factor predictivo para el diagnóstico de infección por dengue (167), sin embargo, una prueba de torniquete negativa no es suficiente evidencia para excluir un diagnóstico de DH (168).

166. Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. 1997, Geneva. Chapter 2, Page 13.

167. Phuong H, J de Vries P, Nga T *et al.* Dengue as a cause of acute undifferentiated fever in Vietnam. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:123

168. Walli JP, Biswas A, Aggarwal P, Wig N, Handa R. Validity of tourniquet test in dengue haemorrhagic fever. *J Assoc Physicians India.* 1999 Feb; 47 (2): 203-4).

Nuestros resultados validan los hallazgos encontrados por Villar y Cols (169) en la ciudad de Bucaramanga, en donde la principal manifestación hemorrágica encontrada fue una prueba de torniquete positiva en un muestreo de pacientes sospechosos de infecciones por el virus del dengue.

La trombocitopenia fue un parámetro no estricto para pacientes sospechosos y probables de DH, encontrándose de manera aislada en pacientes con FD. La leucopenia no aparece como un parámetro estricto de medición para distinguir un caso de infección por el virus del dengue de otro tipo de infección viral, sin embargo, se toma en cuenta como hallazgo frecuentemente visto en infecciones por el virus del dengue (170). Este estudio encontró leucopenia en un 40,4 % (17/42) y 66,6 % (6/9) de pacientes con infecciones probables de FD y DH, respectivamente. Este hallazgo se observó durante la fase aguda de la enfermedad con una tendencia de aparición al tercer día de haber iniciado la enfermedad. Se cataloga entonces el conteo leucocitario como una herramienta útil en la detección de casos de infecciones por el virus del dengue.

No fue posible hacer grandes inferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y parámetros bioanalíticos de pacientes probables de DH, puesto que el número de casos encontrado fue bajo [7,8 % (9/115)].

169. Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Criterios clínicos para diagnosticar el dengue en los primeros días de la enfermedad. *Biomédica* 2006; 26:22-30

170. Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. 1997, Geneva. Chapter 2, Page 12.

Durante el año 2007 se reportó para Colombia una proporción de casos sospechosos DH/DF de 10,79 % (171). En nuestro estudio se encontró una relación del 8,5 %, siendo consecuente con la cifra a nivel nacional de casos sospechosos de DH.

6.3 Confirmación de casos

El porcentaje de positividad encontrado para infecciones por el virus del dengue en este estudio [33,9 (39/115)] es similar al obtenido 6 años atrás en la ciudad de Barranquilla [37 % (37/100)] (172).

Los barrios que presentaron mayor número de casos sospechosos coincidieron en tener la mayor positividad de casos confirmados [Porfin: 36,5 % (15/41); Mequejo: 7,3 % (3/41) y Bosque: 7,3 % (3/41)]. Esta concordancia ratifica la importancia y utilidad de los criterios diagnósticos de la OMS para la captación de pacientes sospechosos y el adecuado ejercicio de la vigilancia epidemiológica para esta infección.

Durante el periodo comprendido entre marzo y mayo de 2007, la ocurrencia de infecciones por el virus fue mínima (173). El mayor número de casos se presentó durante el mes de julio.

171. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2007.htm

172. Falconar AKI, De Plata Elsa, Romero-Vivas C. 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. Clin. Vaccine Immunol, Sept. 2006, p. 1044-1051.

173. Condiciones meteorológicas en Colombia durante junio de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 149. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Este pico epidémico ocurrió posterior a un periodo de sequía (junio, 2007), permaneció durante un periodo de lluvias (julio 2007) (174) y disminuyó en el mes de agosto, periodo en el cuál el norte del país presentó aumento histórico en el número de precipitaciones (175). Estudios realizados en Trinidad reportan la correlación positiva entre la época lluviosa y el aumento en la incidencia de FD (176).

La variabilidad diaria, estacional y anual de la temperatura, humedad atmosférica y lluvias puede influenciar la población del mosquito y la competencia vectorial en muchas forma (177). En este caso las lluvias influenciaron positivamente a la mayor ocurrencia de infección por el virus. En otros casos se ha visto que en época de sequía se ha encontrado aumento en la población adulta del vector (178).

174. Condiciones metereológicas en Colombia durante julio de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 150. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

175. Condiciones metereológicas en Colombia durante agosto de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 151. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

176. Chadee DD, Shivnauth B, Rawlins SC, Chen AA. Climate, mosquito indices and the epidemiology of dengue fever in Trinidad (2002 – 2004). *Ann Trop Med Parasitol*. 2007 Jan; 101(1):69-77.

177. Halstead S. Dengue Virus – Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol*. 2008. 53:273–91

178. Moore CG, Cline BL, Tiben ER. 1978. *Aedes aegypti* in Puerto Rico environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 27:1225–31

Las conclusiones al respecto se definen teniendo en cuenta la eficacia en las medidas de control y vigilancia durante la época de mayor ocurrencia de casos, el estudio de los contenedores de agua que presentaron mayor productividad, su correlación con las lluvias y el lugar en donde se encuentren (interior y/o exterior) en la vivienda.

La asociación significativa encontrada entre las variables edad (≤ 12 años) e infección guarda relación con el estudio realizado por Comach y cols (2008). Este obtiene una alta incidencia acumulada (25,8 %) de infecciones en escolares de 5 a 13 años en el estado de Maracay (179). Debe tenerse en cuenta que en esta región hay co-circulación de todos los serotipos del dengue (179). En Indonesia pudo confirmarse la infección por dengue en un alto porcentaje de pacientes sintomáticos en una cohorte prospectiva [83 % (153/183)] entre los 2 y los 14 años (180). En este último estudio, la mayoría de los casos correspondieron a DH [87% (132/153)]. Estos resultados contrastan con los hallados por Egger y Coleman en donde sugieren que los adultos son más propensos que los niños en presentar dengue clínico (181). La virulencia de la cepa circulante y el tipo de respuesta inmune que presente la población (primaria o secundaria) en el momento del estudio puede ser la explicación de esta variante.

179. Comach G, Blair PJ, Sierra G, Guzman D, Soler M, Quintana MC, Bracho-Labadie M, Camacho D, Russell KL, Olson JG, Kochel TJ. Dengue Virus Infections in a Cohort of Schoolchildren from Maracay, Venezuela: A 2-Year Prospective Study. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Sep 12

180. Setiati T, Mairuhu A, Koraka P. et al. Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infectious Diseases* 2007, **7**:22)

181. Egger JR, Coleman P. Age and clinical dengue illness. *Emerg Infect Dis.* (2007)

El *Aedes aegypti* presenta predilección intradomiciliaria (182), siendo los niños y las amas de casa las personas mas expuestas al vector. La asociación estadística encontrada entre edad (≤ 12 años) e infección [OR: 33 (10,13 - 114.5) $p < 0,0001$] y ocupación (estudiante) e infección [OR: 4,14 (1,6 - 10,9) $p = 0,002$] podría correlacionarse con el hecho de que esta población permanece la mayor parte del tiempo en el domicilio.

Las infecciones secundarias presentaron mayor ocurrencia en la población [80,4 % (33/41)]. Es necesaria la recolección de una segunda muestra para la confirmación de los casos en que no es posible aislar el virus.

Un porcentaje importante de casos clínicamente sospechosos [13 % (15/115)] presentaron títulos para IgM y/o IgG sin mostrar aumento cuádruplo en muestras pareadas. La utilización de una muestra única de suero para diagnóstico de estos pacientes hubiese resultado en falsos positivos. Nuestro estudio obtuvo una cifra elevada de infecciones recientes en comparación a las obtenidas por Ocazonez (2,8 %) y Vaughn (2 %) (183,184).. Mientras no haya una prueba altamente sensible y específica en el mercado, es necesaria la obtención de muestras pareadas de suero para confirmar mediante serología el diagnóstico de dengue.

182. Ibid (9)

183. Ocazonez R, Cortés F, Villar LA. Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. **Colombia Médica**. Vol. 36 N° 2, 2005 (Abril-Junio)

184. Vaughn DW, Green S, Kalajanoorj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;81:2-9

6.4 Caracterización clínica de los casos confirmados de FD/DH

Durante el periodo de estudio las formas graves de infección por dengue (DH) tuvieron baja incidencia. Los estadios mas severos se presentaron con menor frecuencia [33,6 % (2/6)]. Ninguna manifestación clínica presentó asociación estadística con respecto a la confirmación de la infección. Esto potencia la teoría de cuan inespecíficos pueden ser los signos y síntomas en fase aguda de la enfermedad.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios en donde síntomas constitucionales como dolor de cabeza, dolor corporal/irritabilidad, escalofríos y dolor retroocular presentaron mayor frecuencia en pacientes con infección por dengue, siendo FD la forma clínica mas frecuente (185, 186).

La prueba de torniquete y las petequias generalizadas fueron las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes en pacientes infectados. Estas dos características no pueden tomarse aisladamente para predecir diagnóstico.

185. Wichmann O, Stark Klaus, Shu PY. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMS Infectious Diseases* 2006, **6**:120

186. Khan NA, Azhar EI, El-Fiky S, Madani HH, Abuljadial MA, Ashshi AM, Turkistani AM, Hamouh EA. Clinical profile and outcome of hospitalized patients during first outbreak of dengue in Makkah, Saudi Arabia. *Acta Trop.* 2008 Jan;105(1):39-44. Epub 2007 Sep 29

El conteo leucocitario en fase aguda ($< 4000/\text{mm}^3$) mostró asociación estadística en los pacientes confirmados [OR: 4,7 (1,73-12,95) $p = 0,0005$]. El punto de corte utilizado fue el mismo que tomó Villar y cols en Bucaramanga. En su estudio, este fue útil al emplearse en una escala diagnóstica que puede predecir infección por dengue (187). Otros trabajos demuestran un porcentaje de leucopenia más alto en pacientes con infecciones confirmadas, tanto en situaciones en donde FD ha sido la forma clínica dominante (188) como en aquellos en donde DH ha presentado mayor ocurrencia (189). También se documenta la presencia de este hallazgo en el momento de admisión a la urgencia (190). La disminución en el conteo de leucocitos es un parámetro útil que asociado a una buena historia clínica y un adecuado examen físico aproximan al clínico a un diagnóstico acertado en los primeros días de la enfermedad. Se debe tener en cuenta que el conteo de leucocitos aislado no es ni siquiera útil para diferenciar entre una infección bacteriana de una viral (191). Cuando la leucopenia se estudia en combinación con otros parámetros (conteo plaquetario, exantema, ausencia de rinorrea, prueba de torniquete, ausencia de diarrea y artralgia) ha resultado útil para diagnosticar infección por dengue de manera oportuna en ciertos contextos geográficos y epidemiológicos (187).

187. Ibid (8)

188. Ying RS, Tang XP, Zhang FC, et al. Clinical characteristics of the patients with dengue fever seen from 2002 to 2006 in Guangzhou. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2007 Jun;21(2):123-5

189. Butt N, Abbassi A, Munir SM, Ahmad SM, Sheikh QH. Haematological and biochemical indicators for the early diagnosis of dengue viral infection. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008 May;18(5):282-5

190. Ali N, Usman M, Syed N, Khurshid M. Haemorrhagic manifestations and utility of haematological parameters in dengue fever: a tertiary care centre experience at Karachi. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(11-12):1025-8. Epub 2007 May 30

191. Stephens M, Smith WR, Hitchcock K, Hallgren JD. Clinical inquiries. Can you differentiate bacterial from viral pediatric infections based on the CBC? *J Fam Pract*. 2007 May;56(5):390-2

Las infecciones por dengue no mostraron asociación en cuanto a presencia de trombocitopenia. Pacientes con infección por dengue descartada también presentaron disminución de plaquetas [12,8 % (9/70)]. Durante el periodo de estudio en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana, el virus del dengue no fue el único agente etiológico productor de síndromes febriles asociados a trombocitopenia.

La hemoconcentración, al igual que la trombocitopenia, no fue exclusiva de pacientes con dengue. Un 4,28 % (3/60) de pacientes presentaron síndrome febril sin foco aparente asociado a hemoconcentración con infección por dengue descartada.

Los dos casos de malaria evidencian cuan confuso puede ser un diagnóstico en los primeros días de la enfermedad. En estos, las características clínicas y serológicas de los pacientes reunieron todos los criterios de la OMS para ser considerados casos probables de DH. El agente etiológico encontrado fue *P. vivax*. Esta forma de presentación clínica se ha venido reportando en los últimos años (192, 193, 194) caracterizada por síndromes febriles sin foco aparente de inicio súbito, concomitantes con trombocitopenia, leucopenia, y de curso clínico agresivo.

192. Vij AS, Dandona PK, Aggarwal A. Malaria with marked thrombocytopenia: report of 2 cases. J Indian Med Assoc. 2008 Feb;106(2):123, 125

193. Kumar A, Shashirekha. Thrombocytopenia--an indicator of acute vivax malaria. Indian J Pathol Microbiol. 2006 Oct;49(4):505-8.)

194. Koltas IS, Demirhindi H, Hazar S, Ozcan K. Supportive presumptive diagnosis of Plasmodium vivax malaria. Thrombocytopenia and red cell distribution width. Saudi Med J. 2007 Apr;28(4):535-9

La presentación de títulos IgM en estos pacientes y en tres casos más de pacientes hospitalizados refleja la necesidad de tomar muestras pareadas para confirmar o descartar un diagnóstico. De los tres pacientes hospitalizados con diagnóstico sospechosos de DH, un caso no registró títulos para IgM/IgG, y su diagnóstico quedó inconcluso. Es necesario la consecución de estudios que evalúen agentes etiológicos diferente a dengue, productores de síndromes febriles agudos asociados a hemoconcentración, trombocitopenia y hemorragias, tales como hantavirus, leptospiras patógenas e incluso infecciones por alphavirus.

6.5 Tipo de infección y presentación clínica

Los resultados encontrados respaldan la hipótesis que sugiere el riesgo de presentar un cuadro clínico severo en infecciones secundarias (195,196). Sin embargo, este tipo de respuesta inmune no es predictora de DH (197,198)

195. Burke DS, Nisalak A, Johnson D, Scott MR. (1998). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 5. 682-692

196. Halstead SB. Observations related to patogénesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discusión. *Yale J Biol Med* 1970;42(5):350-62

197. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008 Mar 15;197(6):817-24

198. Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology*. 2008 Oct 25;380(2):296-303. Epub 2008 Sep 6

Los casos mas graves de infección por dengue deben correlacionarse con el serotipo y la virulencia de la cepa circulante (199,200). En nuestro estudio todos los casos de DH correspondieron a infecciones secundarias, no obstante, la gran mayoría de pacientes con FD también presentaron este tipo de respuesta inmune.

Estas observaciones se han descrito en estudios epidemiológicos realizados en áreas geográficas donde el virus del dengue ha ocasionado grandes epidemias cuyas formas clínicas han sido las más severas (199,201).

La forma de aparición de la enfermedad fue de tipo súbito en la mayoría de los casos. Se debe hacer énfasis en el interrogatorio del paciente sobre el patrón febril. Esto podría ayudar al clínico a diferenciar entre otros síndromes febriles de aparición insidiosa (fiebre tifoidea, neumonías atípicas).

199. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S and Morier L. (1990) Dengue hemorrhagic fever in Cuba. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 179-184)

200. Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Najjoulah F, Plumelle Y, Fonteau C, Dussart P, Césaire R. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Jun;78(6):990-8

201. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, July, 1998, p. 480-496

El recuento bajo de leucocitos es buen indicador de infección viral, mas no un parámetro de alta especificidad que por si solo pueda predecir severidad del cuadro clínico para infecciones por dengue (202), puesto que el rango de ocurrencia de leucopenia es variable. En series de casos ha llegado a ser tan alto afectando el 100 % de los pacientes estudiados (203), mientras en otros estudios solo ha alcanzado el 52,8 % (204). Nuestro estudio solo alcanza el 33,3 % de los pacientes tanto en infección primaria como en infección secundaria.

La trombocitopenia fue nula en infecciones primarias, sin embargo, en infecciones secundarias se encontró disminución de plaquetas ($\leq 100,000 / \text{mm}^3$) en un 36,3 % (12/33), La alta prevalencia de trombocitopenia en infecciones secundarias se ha demostrado en estudios experimentales en donde los niveles de IgM/IgG anti-dengue asociados a plaquetas se correlacionan significativamente de forma positiva con el conteo plaquetario durante la fase aguda de la enfermedad (205).

202. Ibid (8).

203. Saleem K, Shaikh I. Skin lesions in hospitalized cases of dengue Fever. : *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008 Oct;18(10):608-11

204. Butt N, Abbassi A, Munir SM, Ahmad SM, Sheikh QH. Haematological and biochemical indicators for the early diagnosis of dengue viral infection. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008 May;18(5):282-5

205. Saito M., Oishi K, Inoue S. *et al.* Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol* 2004; 138 :299–303

Todos los hemogramas que reportaron trombocitopenia en este estudio fueron realizados durante fase aguda de la enfermedad. Se ha estudiado la importancia de este dato aislado como factor predictor de síndromes febriles de tipo dengue, encontrándose que es más específico que sensible (206).

El conteo plaquetario asociado a hemoconcentración es uno de los criterios claves para clasificar un paciente en DH. Nuestros hallazgos sugieren que ante sospecha clínica de infección por dengue, es de gran utilidad ordenar un hemograma a partir del segundo día de iniciado los síntomas.

El reporte que hace este estudio acerca un lactante de 3 meses que desarrolló DH y cuyo tipo de respuesta inmune fue secundario refleja los hallazgos encontrados en estudios epidemiológicos realizados en Tailandia, en donde niños nacidos de madres con anticuerpos para dengue desarrollan las formas severas de la enfermedad cuando son infectados por primera vez (207). No podemos afirmar que este haya sido el caso del lactante (solo se tomó una muestra única de suero a la madre asintomática) pero podría ser el mecanismo que explique la severidad de su cuadro clínico.

206. Tong SF, Aziz NA, Chin GL. Predictive value (of thrombocytopaenia in the diagnosis of dengue infection in outpatient settings. *Med J Malaysia*. 2007 Dec;62(5):390-3

207. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever. A public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):1-21

6.6 Evaluación de la prueba de torniquete

Los datos obtenidos en este estudio reflejan una prueba con baja sensibilidad y alta especificidad para orientar el diagnóstico de infección por dengue. La prueba fue realizada durante la fase aguda de la enfermedad siendo positiva en todos los casos de DH.

Los resultados de este estudio validan trabajos en donde el porcentaje de positividad es mas alto en DH que FD (208,209). Esto no debe tomarse como parámetro que pueda diferenciar la severidad de la enfermedad (FD/DH), puesto que otros estudios han mostrado baja ocurrencia de la prueba en casos de DH (210). Cao XT y cols, reportan una pobre capacidad de la prueba en diferenciar entre DH y FD en el sur este asiático (211).

Una ocurrencia importante de casos con prueba de torniquete positiva en pacientes sin infección se reporta en este estudio [29,1 % (21/72)]. Un comportamiento similar se observó en estudios realizados en Vietnam, sin embargo, se concluye que una prueba de torniquete negativa no debería excluir el diagnóstico de infección por dengue (211).

208. Kabra SK, Jain Y, Pandei RM, *et al.* (1999). Dengue hemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 294-298)

209. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmanitya S. *et al.* (1997) Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases*. **176**, 313 – 321

210. Wali JP, Biswas A, Aggarwal P, Wig N, Handa R. Validity of tourniquet test in dengue haemorrhagic fever. *J Assoc Physicians India*. 1999 Feb;47(2):203-4

211. Cao XT, Ngo TN, Wills B. *et al.* Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. 7, No. 2, pp 125 – 132

La baja sensibilidad obtenida en este estudio puede atribuirse a que la gran mayoría de infecciones cursaron con FD. Se ha documentado la baja ocurrencia que tiene la prueba en estos casos (212), sin embargo, hay que tener en cuenta que las formas severas de la enfermedad se comportan inicialmente como FD (213).

Se ha documentado mayor sensibilidad cuando el punto de corte es igual o mayor a 10 petequias (214). Se sugiere continuidad en la evaluación de la prueba de torniquete en un contexto epidemiológico en donde los casos severos de infección por dengue sean prevalentes.

212. Ayyub M, Khazindar AM, Lubbad EH, Barlas S, Alfi AY, Al-Ukayli S. Characteristics of dengue fever in a large public hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2006 Apr-Jun;18(2):9-13)

213. Dengue Haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Second Edition. World Health Organization. 1997, Geneva. Chapter 2, Page 14

214. Ibid (211)

6.7 Evaluación de radios de densidad óptica

Las ELISAS de captura para IgM/IgG se han convertido en el método más poderoso para el diagnóstico serológico debido a su alta especificidad, sensibilidad y simplicidad. Mediante esta técnica es posible hacer un diagnóstico correcto con una muestra única de suero (215).

A nivel epidemiológico, los radios de densidad óptica son útiles para determinar el grado de respuesta inmune que pueda presentar una población utilizando una muestra única de suero. Los altos niveles de anticuerpos observados en sueros únicos de fase aguda o convaleciente temprana en pacientes con infecciones secundarias pueden ser útiles para enmarcar un caso sospechoso en uno probable (216).

La escala propuesta por Falconar presentó el mayor porcentaje de concordancia entre los puntos de cortes que clasificaron el tipo de respuesta inmune (primaria o secundaria) en sueros de fase aguda [85,7% (30/35)] con respecto al modelo estandarizado por la OMS (aumento cuádruplo de títulos IgM/IgG en muestras pareadas de suero).

215. Shu PY, Chen LK, Chang SF 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. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul;10(4):622-30).

216. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol 1996;3(6):621-7).

La confirmación serológica debe continuar con la recolección de sueros pareados hasta que exista un método altamente sensible que determine el tipo de infección en una muestra única de suero en cualquier fase de la enfermedad. Es de considerar que un pequeño porcentaje de pacientes presentan infecciones secundarias sin títulos de anticuerpos IgM detectables (217).

217. Lam S.K., Devi S., Pang T. Detection of specific IgM in dengue infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **1987**;18:532-8.

7. CONCLUSIONES

7.1 Aspectos socio-demográficos

- Los barrios correspondientes a SILOS I y II de estrato socio-económico 1 fueron los mas afectados por el virus del dengue.
- El hábito de almacenamiento de agua en depósitos de grandes volúmenes asociado a la ocupación de la mayoría de los pacientes (estudiantes, pre-escolares, amas de casa) representó un factor de riesgo importante teniendo en cuenta mayor contacto de estos con el vector.
- Existió un riesgo estadísticamente significativo en presentar infección por dengue, edad (≤ 12 años) y ocupación (estudiantes).
- El periodo de mayor ocurrencia de infecciones confirmadas correspondió a una estación lluviosa (julio 2007), por tanto, el estado del tiempo influyó positivamente en la aparición de casos.

7.2 Clasificación de casos sospechosos en FD y DH

- Los criterios de la OMS aplicados estrictamente pudieron clasificar una sospecha clínica de DH en un caso probable con una sensibilidad del 100 %.

7.3 Determinación de infecciones

- El porcentaje de casos confirmados en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana ha mantenido una tendencia similar a la situación de hace 6 años.
- Las infecciones secundarias tuvieron mayor incidencia durante el periodo 2006 – 2007 (80,4%).

7.4 Caracterización de las manifestaciones clínicas en pacientes confirmados

- Las formas severas de DH presentaron baja ocurrencia durante el periodo 2006 – 2007.
- La prueba de torniquete positiva es la manifestación hemorrágica mas frecuente presentada en pacientes sospechosos y probables de FD. El hematoma en venipunción y las petequias generalizadas lo son para casos probables de DH.
- El virus del dengue no es el único agente etiológico responsable de síndromes febriles asociados a trombocitopenia y hemoconcentración en la ciudad de Barranquilla y área metropolitana.

- La leucopenia asociada a una buena historia clínica y examen físico fué de gran utilidad en la predicción de infección por dengue.

- En casos sospechosos de dengue, incluso en aquellos con serología positiva de único suero en prueba rápida, debe tenerse en cuenta diagnóstico diferencial de malaria.

7.5 Tipo de infección y presentación clínica

- Todos los casos confirmados de DH en la ciudad de Barranquilla presentaron respuesta inmune de tipo secundario.
- Un patrón de infección secundaria no revela necesariamente la exposición a dos serotipos diferentes de dengue en lactantes.

7.6 Evaluación de la prueba de torniquete

- La reducción del punto de corte (≥ 10 petequias) aumentó la sensibilidad diagnóstica en un contexto epidemiológico en donde la mayor ocurrencia de casos estuvo dada por FD.
- La prueba de torniquete como parámetro único predictorio de infecciones por el virus del dengue no es útil en casos de FD.

7.7 Radios de densidad óptica

- Los radios de densidad óptica propuestos por Falconar obtuvieron mayor concordancia [85,7 % (30/35)] que los propuestos por Innis, Shu y Kuno al clasificar el tipo de respuesta inmune utilizando sueros únicos de fase aguda.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed FU, Mahmood CB, Sharma JD, et al. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in children the 2000 out break in Chittatong, Bangladesh. *Dengue Bulletin* 2001;25:33–9.
- Ali N, Usman M, Syed N, Khurshid M. Haemorrhagic manifestations and utility of haematological parameters in dengue fever: a tertiary care centre experience at Karachi. *Scand J Infect Dis.* 2007;39(11-12):1025-8. Epub 2007 May 30.
- Ayyub M, Khazindar AM, Lubbad EH, Barlas S, Alfi AY, Al-Ukayli S. Characteristics of dengue fever in a large public hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2006 Apr-Jun;18(2):9-13).
- Bandyopadhyay *et al.* Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*, 2006;11(8):1238-1255.
- Bandyopadhyay S., Lum L.C. and Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health.* volume 11 no 8 pp 1238–1255 august 2006.

- Bhamarapavati, N. (1989) Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*. (Suppl. 4), S826-S829).

- Black, W.C., IV, K. E. Bennett, N. Gorrochotegui-Escalante, C.V. Barillas-Mury, I. Fernandez-Salsa, M. de Lourdes Muñoz, J.A. Farfan-Ale, K.E. Olson, and B.J. Beaty. 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* 33:379-388.

- Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986; 6: 101-102.

- Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever, dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 216-20.

- Bruce L. Innis. Antibody responses to dengue virus infection. Chapter 11. Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: CAB International.

- Burke DS, Nisalak A, Johnson D, Scott MR. (1998). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 5. 682-692.
- Burke, D. S., A. Nisalak, and M. A. Ussery. 1982. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 15:1034–1042.
- Butt N, Abbassi A, Munir SM, Ahmad SM, Sheikh QH. Haematological and biochemical indicators for the early diagnosis of dengue viral infection. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008 May;18(5):282-5.
- Cao XT, Ngo TN, Wills B. *et al.* Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquete test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. 7, No. 2, pp 125 – 132.
- Cardoso, M. J., T. Phaik, and N. Sham. 1988. Development of a dot enzyme immunoassay for dengue 3: a sensitive method for the detection of antidengue antibodies. *J. Virol. Methods* 22:81–88.
- CAREC Surveillance Report, Dengue in the Caribbean 1990; 16: No. 1.

- Chadee DD, Shivnauth B, Rawlins SC, Chen AA. Climate, mosquito indices and the epidemiology of dengue fever in Trinidad (2002 – 2004). *Ann Trop Med Parasitol.* 2007 Jan; 101(1):69-77.
- Christine V. F. Carrington, Jerome E. Foster, Oliver G. Pybus, Shannon N. Bennett, and Edward C. Holmes. Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. *Journal of virology*, Dec. 2005, p. 14680–14687. Vol. 79, No. 23.
- Clarke, D. H., and J. Casals. 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7:561–573.
- Comach G, Blair PJ, Sierra G, Guzman D, Soler M, Quintana MC, Bracho-Labadie M, Camacho D, Russell KL, Olson JG, Kochel TJ. Dengue Virus Infections in a Cohort of Schoolchildren from Maracay, Venezuela: A 2-Year Prospective Study. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 Sep 12.
- Condiciones metereológicas en Colombia durante agosto de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 151. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

- Condiciones metereológicas en Colombia durante julio de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 150. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Condiciones metereológicas en Colombia durante junio de 2007 y proyecciones en el corto, mediano y largo plazo. Informe No. 149. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- Condit RC. Pinciples of Virology. In: Howley PM, editor. Fields Virology. Fourth Edition ed. London-New York – Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins; 2001).
- Cortiñas MG, González DV, Cordero JC, Oliveiras MLL. Dengue hemorrágico. Estudio clínico de 200 pacientes. Revista Cubana de Medicina 38: 13-18, 1999.
- Cuzzubo A, Vaughn DW, Nisalka A, Solomon T. *et al.* Comparison of PanBio Dengue Duo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and MRL Dengue Fever Virus Immunoglobulin M Capture ELISA for Diagnosis of Dengue Virus Infections in Southeast Asia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* Sept. 1999, p. 705-712.

- Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Pan American Health Organization, Washington, DC, 1994 (Scientific Publication No. 548).
- Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1997.
- Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control, Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. New Delhi, WHO Regional Office for South-East Asia, 1999.
- Despres P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflects modifications of viral structure. *Virology* 1993;196(1):209-19.
- Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Criterios clínicos para diagnosticar el dengue en los primeros días de la enfermedad. *Biomédica* 2006;26:22-30.
- Dung NM, Day NP, Tam DT, et al. Fluid replacement in dengue shock syndrome: a randomized, double-blind comparison of four intravenous-fluid regimens. *Clin Infect Dis* 1999;29:787-94.

- Effler P.V., Pang L., Kitsutani P., Vorndam V. *et al.* Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11, No. 5, May 2005. www.cdc.gov/eid.
- Egger JR, Coleman P. Age and clinical dengue illness. *Emerg Infect Dis*. (2007).
- 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. *Arch Virol* 1997; 142: 897–916.
- Falconar AKI, De Plata Elsa, Romero-Vivas C. 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. *Clin. Vaccine Immunol*, Sept. 2006, p. 1044-1051.
- George R: Problems in diagnosis and classification of dengue virus infection. *Malys J Pathol* 1993, 15:25-27.
- Gibbons R, Vaughn D. Dengue: an escalating problem. *Clinical Review*. *BMJ*. 2002;324:1568-6.

- Graham H. The dengue. A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med* 1903;6:209).
- Groen, J., P. Koraka, J. Velzing, C. Copra, and A. D. M. E. Osterhaus. 2000. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:867–871.
- Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, July, 1998, p. 480-496.
- Gubler, D. J. 1988. Dengue, p. 223–260. *In* T. P. Monath (ed.), *Epidemiology of arthropod-borne viral diseases*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Gubler, D. J., and G. E. Sather. 1988. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 291–322. *In* A. Homma and J. F. Cunha (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.
- Guía de Atención del Dengue. Servicio de Salud de Colombia, 2000. En <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>
- Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 2008.

- Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis.* 2008 Mar 15;197(6):817-24.
- Guzmán MG, Kourí G, Valdés G, Valdés L, Bravo J, Vásquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks.
- Guzman MG, Kouri G, Vazquez S, et al. DHF epidemics in Cuba, 1981 and 1997: some interesting observations. *Dengue Bulletin* 1999;23:39–43).
- Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(6):621-7).
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S and Morier L. (1990) Dengue hemorrhagic fever in Cuba. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 179-184).
- Guzman, M. G., and G. Kouri. 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:621–627.

- Halstead S. Dengue Virus – Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2008. 53:273–91.
- Halstead SB. (1989) Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage: a pathogenic cascade. *Reviews of Infectious Diseases* 11 (Supp. 4), S830 – S839.
- Halstead SB. ADE (Antibody dependent Enhancement. Host response to dengue infection. In: *Dengue digest*. Vol 2, No. 2, July 2005.
- Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever. A public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 1980;58(1):1-21.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370:1644-52.
- Halstead SB. Dengue-virus mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2008. 53:273–91 *Annu. Rev. Entomol.* 2008.53:273-291.
- Halstead SB. Observations related to patogénesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discusión. *Yale J Biol Med* 1970;42(5):350-62.
- Halstead, SB (1988). Pathogenesis of dengue. Challenges to molecular biology. *Science* 238, 476-481.

- Hammon WM. Dengue hemorrhagic fever. Do we know its cause? *Am J Trop Med Hyg* 1973;22(1):82-91.
- Harris E, Videa E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, Cuadra R, Rocha J, Idiaquez W, Alonso RE, Delgado MA, Campo LA, Acevedo F, Gonzalez A, Amador JJ, Balmaseda A: Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000, 63:5-11.
- Harris, E., T. G. Roberts, L. Smith, J. Selle, L. D. Kramer, S. Valle, E. Sandoval, and A. Balmaseda. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36:2634–2639.
- Hayes CG, Manaloto CR, Gonzales A, Ranao CP. Dengue infections in the Philippines: Clinical and virological findings in 517 hospitalized patients. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 110-6.
- Henschel EA, Putnak JR. The Dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:376-96.
- Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, *et al.* High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol.* 2001 Nov;65(3):553-60.

- Kurane, Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **30** (2007), pp. 329–340.

- Implementation Research. Mobilizing research to halt exponential growth of dengue. TDR News. No 77. February 2007.

- Innis BL. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Exotic Viral Infections*.

- Innis, B. L. 1995. Dengue and dengue hemorrhagic fever, p. 103–146. *In* J. S. Porterfield (ed.), *Exotic viral infections—1995*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

- Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke. 1989. An enzymelinked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 418–427.

- Kabra SK, Jain Y, Pandei RM, *et al.* (1999). Dengue hemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 294-298).
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmanitya S. *et al.* (1997) Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases*. **176**, 313 – 321.
- Kankirawatana P, Chokephaibulkit K, Puthavathana P, Yoksan S, Apintanapong S, Pong-thapisit. V. Dengue infection presenting with central nervous system manifestation. *J Child Neurol* 2000;15: 544-7.
- Khan NA, Azhar EI, EI-Fiky S, Madani HH, Abuljadal MA, Ashshi AM, Turkistani AM, Hamouh EA. Clinical profile and outcome of hospitalized patients during first outbreak of dengue in Makkah, Saudi Arabia. *Acta Trop*. 2008 Jan;105(1):39-44. Epub 2007 Sep 29.
- Koltas IS, Demirhindi H, Hazar S, Ozcan K. Supportive presumptive diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria. Thrombocytopenia and red cell distribution width. *Saudi Med J*. 2007 Apr;28(4):535-9.

- Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, *et al.* Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4154-9.
- Kumar A, Shashirekha. Thrombocytopenia--an indicator of acute vivax malaria. *Indian J Pathol Microbiol.* 2006 Oct;49(4):505-8).
- Kuno, G., A. V. Vorndam, D. J. Gubler, and I. Gomez. 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. *J. Med. Virol.* 32:102–108.
- Kuno, G., I. Gomez, and D. J. Gubler. 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods* 33:101–113.
- Kurane I, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* Oxon, UK: CBA International; 1997. p. 273–90.
- Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology.* 2008 Oct 25;380(2):296-303. Epub 2008 Sep 6.

- Lam S.K., Devi S., Pang T. Detection of specific IgM in dengue infections. Southeast Asian J Trop Med Public Health **1987**;18:532-8.
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G & Vorndam, V. (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30, 545-551.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999; 73:4738-47).
- Libraty DH, Myint KSA, Murray CK, Gibbons RV, Mammen MP, et al. (2007) A Comparative Study of Leptospirosis and Dengue in Thai Children. PLoS Negl Trop Dis 1(3): e111.
- Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. Viral Immunol. 2006 Summer;19(2):127-32. Review.
- Lin YS, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. Curr Pharm Des. 2004;10(2):213-21. Review.

- Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Review. *Postgrad Med J* 2004;80:588–601.
- Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Review. *Postgrad Med J* 2004;80:588–601.
- Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades Infecciosas, principios y práctica. Vol. 2. Edit. Panamericana. Cap. 142. Pag. 2092.
- Mathew A, Kurane I, Green S, et al. Predominance of HLA- restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotypecross-reactive epitopes on non structural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol.* 1998;72:3999.
- Méndez A, González G. Dengue Hemorrágico en niños: diez años de experiencia clínica. *Biomédica* 2003;23:180-93.
- Moore CG, Cline BL, Tiben ER. 1978. *Aedes aegypti* in Puerto Rico environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:1225–31.

- Murray P., Kobayashi G., Pfaller M., Rosenthal K. Microbiología médica. Segunda edición. Cap. 63, pag 651.
- Muzaffar J, Venkata Krishnan p, Gupta n, Kar P. Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone region. *C a s e R e p o r t*. Singapore Med J 2006; 47(11) : 975.
- Narayanan M, Aravind MA, Thilothammal N, et al. Dengue fever epidemic in Chennai—a study of clinical profile and outcome. *Indian Pediatr* 2002;39:1027–33.
- Ngo NT, Cao XT, Kneen R, et al. Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour. *Clin Infect Dis* 2001;32:204-13.
- Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregión. www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2007.htm
- Ocazonez R, Cortés F, Villar LA, Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colombia Médica*. Vol. 36 N° 2, 2005 (Abril-Junio).

- Ocazonez R, Gómez S, Cortés F. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. Rev. Salud Pública. 9 (2):262-274, 2007.
- Ognan C. MSc Thesis (2007) An evaluation of different intervention methods against the immature stages of *Aedes aegypti* in the Atlántico Department, Colombia. London School of Hygiene and Tropical Medicine.
- OPS/OMS. Dengue en las Américas: Resumen 2007. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas. Vol. 4, No. 9 (26 septiembre, 2007).
- OPS/OMS. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica No. 548: Washington DC; 1995. P. 109.
- Padilla JC. Situación del Dengue en Colombia. Simposio Internacional de Fiebres Hemorrágicas, 2006, Barranquilla. Universidad del Norte.
- Pancharoen C, Mekmullica J, Thisyakorn U. Primary dengue infection: what are the clinical distinctions from secondary infection? Southeast Asian J Trop Med Public Health 2001;32:476–80.

- Philips ML. Dengue Reborn. Widespread resurgence of a resilient vector. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 116, Number 9, September 2008.
- Phuong H, J de Vries P, Nga T *et al*. Dengue as a cause of acute undifferentiated fever in Vietnam. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:123.
- Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*.1997; 50, 161-169).
- Pletnev AG, Pletnev AG, Bray M, Lai CJ. Chimeric tickborne encephalitis and Dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* 1993; 67:4956-63.
- Porter K., Widjaja S., Lohita HD., *et al*. Evaluation of a Commercially Available Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Diagnosing Acute Dengue Infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, Sept. 1999, p. 741.744.
- Pungjitprapai A, Tantawichien T. A fatal case of spontaneous rupture of the spleen due to dengue virus infection: case report and review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008 May;39(3):383-6.

- Rajapakse S. Corticosteroids in the treatment of dengue illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2008).
- Rice CM. Overview of flaviviruses molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *South East Asian J Trop Med Public Health* 1990;21(4):670-7).
- Rigau J. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 297–302.
- Romero-Vivas C.M.E., Leake C.J, Falconar AKI- Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Medical and Veterinary Entomology* (1998) 12, 284-288.
- Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK. 2006, Pupal productivity surveys to identify the key containers habitats of *Aedes aegypti* (L) in Barranquilla the principal sea port of Colombia *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Apr;100 Suppl 1:S87-S95.
- Romero-Vivas CM, Arango-Padilla P, Falconar AK. Pupal-productivity surveys to identify the key container habitats of *Aedes aegypti* (L.) in Barranquilla, the principal seaport of Colombia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Apr;100 Suppl 1:S87-S95.

- Romero-Vivas CM, Llinás H, Falconar AK. Three calibration factors, applied to a rapid sweeping method, can accurately estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) pupal numbers in large water-storage containers at all temperatures at which dengue virus transmission occurs. *J Med Entomol.* 2007 Nov;44(6):930-7.

- Rothman AL. Immunology and Immunopathogenesis of Dengue Diseases. *Advances in virus research*, 2003, Vol. 60, p397-419.

- Russell, P. K., A. Nisalak, P. Sukhavachana, and S. Vivona. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 99:285–290.

- Saito M., Oishi K, Inoue S. *et al.* Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol* 2004; 138 :299–303.

- Saleem K, Shaikh I. Skin lesions in hospitalized cases of dengue Fever. : *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008 Oct;18(10):608-11.

- Samuel PP & Tyagi BK. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J Med Res* 123, May 2006, pp 615-628.
- Sanders, E. J., J. G. Rigau-Perez, H. L. Smits, C. C. Deseda, V. A. Vorndam, T. Aye, R. A. Spiegel, R. S. Weyant, and S. L. Bragg. 1999. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:399–404.
- Sa-NGasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakij S, Pattanakul K, Sawanpanyalert P, Kurane I. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol Infect.* 2006 Aug;134(4):820-5. Epub 2005 Dec 22.
- Secretaría de Salud. Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue. Estados Unidos de México. Cap- 3, pag. 16-21.
- Seijo A. Dengue grave: generalidades e inmunopatogenia. En: *Dengue grave. Asociación de Alergia, Asma e Inmunología "Buenos Aires"*. Junio 1999.

- Setiati T *et al.* Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infectious Diseases* 2007, **7**:22.
- Setiati T, Mairuhu A, Koraka P. *et al.* Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infectious Diseases* 2007, **7**:22).
- Shu PY, Chen LK, Chang SF *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. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul;10(4):622-30).
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, *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. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10: 622–30.
- Shu PY, Huang JH. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* July, 2004, Vol. 11, No.4. p. 642-650.

- Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. 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.
- Shu, P.Y., and J.H. Huang. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:642-650.
- Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. 1926. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philipp. J. Sci.* 29:1–304.
- Simposio Internacional de Fiebres Hemorrágicas. Situación del Dengue en Colombia. Julio Cesar Padilla.
- Soler, J.F., Hall, M.W. and Hitchens, A.P. (1926) Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.*, **29**, 1-302.

- Solomon T, Dung NM, Vaughn D, Kneen R, Thao LTT, Raengsakulrach B, Loan HT, Day NPJ, Farrar J, Myint KSA, Warrell MJ, James WS, Nisalak A, White NJ. Neurological manifestations of dengue infection. THE LANCET, Vol 355, March 25, 2000.
- Sriurairatna, S., and N. Bhamarapavati. 1977. Replication of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* mosquitoes. An electron microscopic study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:1199-1205.
- Stephens M, Smith WR, Hitchcock K, Hallgren JD. Clinical inquiries. Can you differentiate bacterial from viral pediatric infections based on the CBC? J Fam Pract. 2007 May;56(5):390-2.
- Suarez, M. F., and M. J. Nelson, M. J. 1981. Registro de altitud de del *Aedes aegypti* en Colombia. Biomédica (Bogotá) 1:225.
- Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant Dengue Type virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. Virol 1996;216:317-25.
- Tanner L., Schreiber M., Low GHJ, *et al.* Decision Tree Algorithms Predict the Diagnosis and Outcome of Dengue Fever in the Early Phase of Illness. Neglected Tropical Diseases. 2008, Vol. 2, Issue 3, e196.

- Thanh CXT, Nhan NT, Wills B. *et al.* Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vie Nam. *Tropical Medicine and International Health*. Vol. 7 No. 2 pp 125-132 February 2002.

- Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Najjioullah F, Plumelle Y, Fonteau C, Dussart P, Césaire R. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Jun;78(6):990-8.

- Tong SF, Aziz NA, Chin GL. Predictive value (of thrombocytopaenia in the diagnosis of dengue infection in outpatient settings. *Med J Malaysia*. 2007 Dec;62(5):390-3.

- Tsai F. T. Flavivirus. Volumen 2. Enfermedades Infecciosas, (142) Theodore F. Tsai

- Uehara PM, da Cunha RV, Oliveira GR, e de Oliveira PA. Envolvimento hepático em pacientes com dengue hemorrágico: manifestação rara? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(6): 544-547, nov-dez, 2006

- Vathanophas, K., W. M. Hammon, R. W. Atchison, and G. E. Sather. 1973. Attempted type specific diagnosis of dengue virus infection by the indirect fluorescent antibody method directed at differentiating IgM and IgG responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:697–702.
- Vaughn DW, Green S, Kalajanoorj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;81:2-9.
- Vij AS, Dandona PK, Aggarwal A. Malaria with marked thrombocytopenia: report of 2 cases. *J Indian Med Assoc.* 2008 Feb;106(2):123, 125.
- Wali JP, Biswas A, Aggarwal P, Wig N, Handa R. Validity of tourniquet test in dengue haemorrhagic fever. *J Assoc Physicians India.* 1999 Feb;47(2):203-4.
- Wichmann O, Stark K, Shu P-Y, Niedrig M, Frank C, Huang JH and Jelinek T, Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:120.

- Wills BA, Dung NM, Loan HT, Tam DTH, Thuy TTN, Minh L, Diet TV, Hao NT, Chau NV, Stepniowska K, White NJ, Farrar J. Comparison of Three Fluid Solutions for Resuscitation in Dengue Shock Syndrome. *n engl j med* 353;9. September 1, 2005.
- World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines. WHO Regional publication, SEARO, No 29, 1999.
- Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods* 2003;114(1):45-54.
- Xu H, Di B, Pan YX, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2872–78.
- Ying RS, Tang XP, Zhang FC, et al. Clinical characteristics of the patients with dengue fever seen from 2002 to 2006 in Guangzhou. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2007 Jun;21(2);123-5.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ficha epidemiológica

FORMULARIO PARA LA INVESTIGACION DE CASOS DE FIEBRE DENGUE, DENGUE HEMORRAGICO, SINDROME DE CHOQUE POR DENGUE Y OTRAS ENFERMEDADES HEMORRAGICAS EN EL DISTRITO DE BARRANQUILLA Y AREA METROPOLITANA

DATOS GENERALES

1. Fecha de notificación del caso al investigador Día _____ Mes _____ Año _____
2. Fecha de hospitalización Día _____ Mes _____ Año _____
3. Nombre de quién diligencia la ficha epidemiológica _____

DATOS DEL PACIENTE

4. 1er Apellido _____ 2do Apellido _____ Nombres _____
5. Identificación _____
6- Sexo: Masculino () Femenino ()
7. Edad _____ Fecha de nacimiento Día _____ Mes _____ Año _____
8. Raza: Blanco _____ Negro _____ Indígena _____ Mestizo _____
9. Ocupación _____
10. Lugar de origen: Departamento _____ Municipio _____
11. Dirección _____ Casa () Apartamento ()
Barrio _____
Teléfono _____ Celular _____
12. Cuánto hace que vive en ese lugar? _____
13. Dirección de estudio o trabajo _____ Tel: _____ Barrio _____
14. Ha viajado a otros lugares entre 3 meses a 10 días anteriores a la aparición de la enfermedad? Si () No ()
Dónde _____
15. En que otro sitio diferente a la residencia o al lugar de trabajo y/o estudio pasa gran parte del tiempo?

16. Antecedentes personales patológicos:

- Eruptivas Si () No () Describa _____
Alérgicas Si () No () Describa _____
Hematológicas Si () No () Describa _____

Otra Enfermedad Si () No () Cuáles? _____

17. Esquema de vacunación: Completo () Incompleto () T
Trae carnet de vacunación Si () No ()
Otras vacunas (fiebre amarilla u otras, especificando fechas y número de dosis)

18. Fecha de inicio de los síntomas: Día _____ Mes: _____ Año: _____

19. Forma de inicio de la enfermedad: Súbita () Insidiosa ()

20. Fecha de toma de muestra de suero:

- 1era muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para (enfermedad) _____
2da muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para (enfermedad) _____
Otra muestra: Día _____ Mes _____ Año _____ Para (enfermedad) _____

Biopsias o muestras de otros tejidos:

21. Ha tenido dengue (fiebre, dolor corporal y erupción) antes? Si () No () No sabe ()
Cuándo? _____

LEPTOSPIROSIS Y HANTAVIRUS

22. Contacto con personas con enfermedad similar: Si () No () Cuándo? _____

23. Ha estado en contacto o ha sido mordido por animales o ha visto alguno en su casa?

Si () No () Cuál animal? _____

24. Ha visto roedores cerca de su casa? Si () No () Dónde? _____

LEPTOSPIROSIS

25. Acostumbra bañarse en ríos, lagunas, arroyos o similares? Si () No ()

26. Se ha bañado en las últimas dos semanas en ríos, lagunas o similares? Si () No ()

27. De que material es el techo de su vivienda? _____

28. De que material son las paredes de su vivienda? _____

30. El abastecimiento de agua para la vivienda es de:

Pozo () Potable () Río () Carro tanque () Otros ()

DATOS CLINICOS EN LA URGENCIA

Síntoma	Si	No	No sabe	
22. Fiebre				43. Prueba de Torniquete >20 petequias en 2.5 cm cuadrados
23. Dolor de Cabeza				Positiva: Negativa: No se hizo:
24. Dolor de Ojos				44. Pulso 45. Tensión Arterial:
25. Dolor Corporal				Hemograma:
26. Erupción				45. Leucocitos:
27. Náusea/Vómito				Diferencial Neutrófilos:
28. Diarrea				Linfocitos:
29. Escalofríos				Monocitos:
30. Tos				Eosinófilos:
31. Petequias				Basófilos:
32. Púrpura/Equimosis				46. Glóbulos Rojos
33. Hematemesis				47. Hemoglobina
34. Melena				48. Hematocrito
35. Epistaxis				49. MCV
36. Hemorragia Gingival				50. MCH
37. Hematuria				51. MCHC
38. Hemorragia Vaginal				52. Plaquetas
39. Congestión nasal				53. Frotis de sangre:
40. Dolor de garganta				Linfocitos atípicos
41. Ictericia				OTROS DATOS
42. Artralgia				54. Anuria
				55. Linfadenopatías
				56. Hepatomegalia
				57. Encefalitis
				DESCRIPCION DE LA ERUPCION
				58. Se remite a hospitalización? Si ___ No ___

Anexo 2. Consentimiento informado para pacientes ambulatorios

CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

Estimado (a) Paciente y/o Acudiente:

Como parte de un proyecto de investigación apoyado por COLCIENCIAS, la Universidad del Norte de Barranquilla y la Secretaria de Salud Distrital, requerimos obtener muestras de sangre durante la fase aguda y convaleciente de su enfermedad de usted o su familiar menor de edad, así como también requerimos de información necesaria para llenar una ficha epidemiológica. Mediante este proyecto, se desea identificar cual es el agente causal del serotipo y la cepa del virus del Dengue, conocer el comportamiento de la enfermedad en la región y poder en un futuro implementar un programa de vigilancia y control. El nombre de su familiar, el suyo y la información suministrada serán confidenciales. El resultado positivo o negativo para dengue o leptospirosis, le será informado por la autoridad de salud.

Usted está en libertad de permitirnos o no obtener las muestras de sangre, sin ningún tipo de retaliación en caso de que se niegue a participar en el estudio.

Dra. Claudia Romero-Vivas, PhD
Profesor Investigador Co-Supervisora
Científico

Dr. Andrew K.I. Falconar, PhD
Profesor Investigador

Departamento de Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Norte
Km. 5 Antigua vía a Puerto Colombia
Tel: 3509285
Fax: 3598852

Yo, _____, identificado (a) con cédula de ciudadanía, _____ de la ciudad de _____ permito la obtención de mi persona o mi familiar menor de edad, _____ con identificación (tarjeta de identidad o registro civil), _____ de dos muestras de sangre para el presente estudio.

Firma del Acudiente: _____

Fecha: _____

Doctor a cargo del paciente _____

Anexo 3. Formulario para pacientes hospitalizados

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION

Coordinadores del Proyecto

Dr. Andrew Falconar, PhD
Investigador Principal
Grupo de Investigación en
Enfermedades Tropicales

Dra. Claudia Romero-Vivas, PhD
Co-supervisor Científico
Grupo de Investigaciones en
Enfermedades Tropicales

Dr. Napoleón De la Ossa, MD
Asistente de Investigación.
Grupo de Investigación en
Enfermedades Tropicales

Participantes del Proyecto

Dra. Natalia Ruiz, MD
Subdirección Científica
Hospital Pediátrico de Barranquilla
REDEHOSPITAL

Dra. Gray Zuñiga, MD
Dirección Médica
Hospital Universidad del Norte

Dra. Elsa de Plata
Secretaría Departamental de Salud
Pública

Título del estudio

Caracterización Clínica de Pacientes con Fiebre Dengue, Dengue Hemorrágico en la Ciudad de Barranquilla (Atlántico). Periodo 2006 – 2007.

Este consentimiento informado tiene tres partes:

1. Información acerca el Estudio de Investigación
2. Formato de Consentimiento Informado
3. Consentimiento adicional
4. Consentimiento de acceso al contenido de la Historia Clínica

PRIMERA PARTE

El Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte es un equipo de investigación conformado por personal del área de la salud y la ciencia interesado en trabajar y buscar soluciones a la problemática de las enfermedades transmitidas por vectores (insectos) y de carácter tropical que afectan nuestro entorno.

La infección por el virus del Dengue es la enfermedad transmitida por vectores (mosquito *Aedes aegypti*) que afecta la población de nuestra región en mayor porcentaje. Dicha infección tiene un amplio rango de signos y síntomas que abarcan desde una enfermedad inaparente hasta graves complicaciones con compromiso del sistema circulatorio y la muerte. Nuestra región tiene todas las características geográficas para la diseminación de la enfermedad y el aumento en el número del vector.

Como parte de un proyecto de investigación financiado por COLCIENCIAS y apoyado por la UNIVERSIDAD DEL NORTE y la Secretaria Distrital de Salud Pública, es de nuestro total interés conocer la forma de presentación de esta enfermedad en los pacientes de nuestra

región y de esta manera realizar un diagnóstico rápido y eficaz de la enfermedad con criterios que se adapten a nuestra población.

Nuestra meta es generar conocimiento que aporte y valide las herramientas diagnósticas utilizadas en la actualidad y que ayuden a pacientes que, como usted, padezcan de esta entidad.

Usted o su familiar menor de edad ha(n) sido escogido(s) para participar en este estudio por encontrarse en el **HOSPITAL PEDIATRICO DE BARRANQUILLA / HOSPITAL UNIVERSIDAD DEL NORTE** y creemos que usted o su familiar menor de edad puede tener Dengue. La participación en nuestro estudio es **TOTALMENTE VOLUNTARIA**. Si usted decide no participar en este estudio, usted o su familiar menor de edad se le dará igual manejo médico, sin ningún tipo de retaliación.

Nuestro estudio requiere obtener muestras de sangre durante la fase aguda y convalescente (dos muestras de sangre en totalidad) de la enfermedad de usted o su familiar menor de edad, así como también requerimos información necesaria para llenar una ficha epidemiológica.

Las muestras de sangre tomadas para las pruebas rutinarias de laboratorio serán analizadas en nuestro estudio, de tal manera que usted o su familiar menor de edad no necesitará un pinchazo o extracción de sangre adicional para participar en esta investigación. Los estudios adicionales que se realicen de estas muestras no serán cobrados **DE NINGUNA FORMA**. El diagnóstico de laboratorio le será dado por la **SECRETARIA DISTRITAL / DEPARTAMENTAL DE SALUD PUBLICA**.

La muestra de sangre de la fase convalescente será tomada en su domicilio, si allí se encontrase usted o su familiar menor de edad, pasados 2 a 14 días (idealmente entre los días 10 a 12) desde la toma de la primera muestra de sangre.

Cuando la muestra de sangre sea tomada, tanto en el Hospital como en su domicilio, este procedimiento puede doler un poco. Se puede presentar una leve inflamación que resolverá espontáneamente. Hay muy poca probabilidad de infección. Se extraerá una cantidad no superior a 5 ml de sangre.

El que usted o su familiar menor de edad sea participe de este estudio no le representará retribución económica alguna, pero si ayudará en un futuro a pacientes que como usted, padecen de infección por el virus del Dengue. Su caso aporta conocimiento a la comunidad científica.

Si usted decide participar en este estudio, **SU INFORMACION SE MANTENDRA CONFIDENCIAL**. Esto significa que **UNICAMENTE** los médicos, las enfermeras y el personal que lidera y participa este estudio pueden acceder a su información.

En cualquier momento de su participación en el estudio usted podrá preguntar cualquier inquietud que tenga y estas le serán resueltas cuantas veces fuese necesario para su entendimiento. La persona encargada de resolver sus dudas e inquietudes será el Dr. Napoleón De la Ossa Merlano, Asistente de Investigación. Teléfono: 3509478

Una vez mas, **SU PARTICIPACION ES TOTALMENTE VOLUNTARIA** y usted puede decidir en **CUALQUIER MOMENTO DEL ESTUDIO** retirarse si así lo quisiese sin ningún tipo de retaliación.

SEGUNDA PARTE

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

En pleno uso de mis facultades mentales entiendo que puedo escoger que mi persona o mi familiar menor de edad pertenezca(n) al estudio de investigación y que puedo dejar de pertenecer a este cuando yo quiera.

He entendido la información que se expone en la primera parte de este consentimiento y se me ha explicado cualquier duda o inquietud.

Estoy de acuerdo en la participación de mi persona o mi familiar menor de edad en este estudio.

Nombre del Participante

**Firma del Participante
(si no es menor de edad)**

**Nombre (s) responsable (s) del menor de edad
(Madre y/o padre)**

Fecha (dd/mm/aa/)

**Firma responsable(s) del menor de edad
(Madre y/o padre)**

PADRE

MADRE

Código del participante en el estudio

**Huella (s) digital (es) índice
derecho (Si el participante o
responsable(s) del menor es
(son) analfabeta (s).**

He sido testigo de la adecuada lectura del consentimiento informado por parte del participante o el responsable del menor de edad. Así mismo, he leído y explicado adecuadamente las 3 partes del documento informado. Hago constar con mi firma:

Nombre del Investigador

Firma del Investigador

Fecha (dd/mm/aa)

TERCERA PARTE

CONSENTIMIENTO ADICIONAL

En miras de ampliar todo nuestro conocimiento en Dengue y otras Enfermedades Hemorrágicas, nos gustaría obtener su permiso para almacenar las muestras de sangres recolectadas de usted o su familiar menor de edad con el fin de utilizarlas en próximos estudios. Estas serán almacenadas en el Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Universidad del Norte.

Nos gustaría usar sus muestras o la de su familiar menor de edad para la investigación de nuevas pruebas diagnósticas para Dengue. Su identidad y la de su familiar menor de edad se mantendrán en secreto y no será conocida por personal ajeno al Estudio de Investigación.

Apruebo que la muestra de sangre sea almacenada y usada en futuros estudios:

Nombre del participante

Nombre de Responsable (s) del menor de edad (padre y/o madre).

Firma de Responsable (s) del menor de edad (padre y/o madre)

Fecha (dd/mm/aa)

En caso de no aprobación:

Nombre del participante

Nombre de Responsable (s) del menor de edad (padre y/o madre).

Firma de Responsable (s) del menor de edad (padre y/o madre)

Fecha (dd/mm/aa)

CUARTA PARTE

ACCESO AL CONTENIDO DE LA HISTORIA CLINICA

Yo, _____ identificado con Cédula de Ciudadanía _____ de _____ apruebo que los Coordinadores del Proyecto de Investigación tengan acceso a la Historia Clínica de mi persona o mi familiar menor de edad, cuantas veces fuera necesario en cumplimiento a lo dispuesto por la resolución 1995 de 1999 del entonces Ministerio de Salud.

Entiendo que mi identidad o la de mi familiar menor de edad permanecerá(n) secreta y no aparecerá(n) en ningún tipo de publicación.

Los Coordinadores del Proyecto se obligan a garantizar la reserva del contenido de la información otorgada mediante esta autorización.

Hago constar con mi firma:

Nombre del Participante

Firma del Participante
(si no es menor de edad)

Nombre (s) responsable (s) del menor de edad
(Madre y/o padre)

Fecha (dd/mm/aa/)

Firma responsable(s) del menor de edad
(Madre y/o padre)



Código del participante en el estudio

Huella (s) digital (es) índice derecho (Si el participante o responsable(s) del menor es (son) analfabeta (s)).

Buffer Fosfato Salino (PBS)	Sodio Fosfato Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	SIGMA (S0876-1KG)	077K0128
	Fosfato Potásico (KH ₂ PO ₄)	Carlo Eaba Code No 361507	Cas N 7778-77-0
	Cloruro de Potasio (KCl)	Carlo Eaba Code No 471177	Cas N 774-40-7
	Cloruro de Sodio (NaCl)	SIGMA (S9625-10 KG)	055K0130
Solución Carbonada-Bicarbonada	Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	SIGMA-ALDRICH (S4019-1KG)	047K00721
	Carbonato de Sodio (Na ₂ CO ₃)	SIGMA-ALDRICH (S2127-500G)	087K0256
Solución de Bloqueo	Gelatina de piel porcina, Tipo A	SIGMA (G6144-500G)	054K0170
Solución de lavado	Monolaurato de Polioxietileno-sorbitán (Tween 20) [®] (C58H114O26)	SIGMA (P1379)	119H0004
	Gelatina de piel porcina, Tipo A	SIGMA (G6144-500G)	054K0170
Azida	Azida de Sodio (NaN ₃)	SIGMA (S2002-25G)	064K0179
Sustrato	Sodio Fosfato Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	SIGMA (50876-1KG)	077K0128
	Acido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	SIGMA (C-0759)	89H1268
	O-Fenilenediamina (C ₆ H ₈ N ₂)	SIGMA (P-1526)	77H5360
	Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	SIGMA (H-1009)	119H3857
Detención de Reacción	Acido Sulfúrico, 18.4 M (H ₂ SO ₄)	Mallinckrodt Chemical	

Anexo 5. Materiales para ELISAS de captura

MATERIAL	CARACTERISTICAS	PROVEDOR
Placas de microtitulaciones para ELISA	Placas de poliestireno con 96 pozos de fondo plano (Immulon [®] 4HBX)	Thermo Electron Corporation
	Placas de poliestireno con 96 pozos de fondo plano (Immulon [®] 2HBX)	
	Placas de poliestireno de ultra alta captación	
Placas de microtitulaciones	Placas de poliestireno con 96 pozos de fondo plano (Immulon [®] 2HBX)	Thermo Electron Corporation
	Placas de poliestireno con 96 pozos de fondo plano (Immulon [®] 4HBX)	
	Placas de poliestireno de alta captación	
Puntas desechables	Puntas universales desechables 1- 220 µl (LW0105)	Alphalaboratories, UK
Pipetas multicanal	Pipeta de 12 canales 5 - 50 µl	BRAND
	Pipeta de 12 canales 20 - 200 µl	
	Transferpette [®] - 12	
Pipetas Simples	Pipetas de 0.5 µl hasta 1000 µl	Gilson NICHIRYO

Anexo 6. Anticuerpos para ELISA de captura IgM/IgG

ESPECIFICACION DEL PRODUCTO	CONCENTRACION	CODIGO	COMPAÑÍA
Anticuerpo de conejo anti IgM humana específico de fragmento Fc5 μ (mínima reacción cruzada con proteínas séricas de ratón)	1.8 mg/ml	309-005-095	Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC
Anticuerpo de cabra anti IgG humana específico de fragmento Fc γ (mínima reacción cruzada con suero de ratón, caballo o bovino)	1.2 mg/ml	109-005-098	Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC
Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (mínima reacción cruzada con proteínas séricas de humano, caballo o bovino)	0.8 mg/ml	115-035-062	Jackson ImmunoResearch, Laboratories, INC

Anexo 7. Solución carbonada-bicarbonada de sodio (1 x)

Carbonato de Sodio ----- 7.95 g

Bicarbonato de Sodio ----- 14.65 g

Agua destilada hasta ----- 500 ml

Anexo 8. Solución sustrato

Sodio fosfato dibásico (0.2 M)

Ácido cítrico (0.1 M) (pH 5.0)

O-Fenilenediamina (0.012 % p/vol))

Peróxido de Hidrogeno (0.09 % vol/vol)

Agua destilada