



UAEM

Universidad Autónoma
del Estado de México



FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO NS1 Y ANTICUERPO IgM PARA EL VIRUS
DEL DENGUE EN ESTUDIANTES DE NIVEL SUPERIOR DE LA UAEMéx**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANNEY LILLIÁN VELÁZQUEZ FLORES

DIRECTOR

DR. EN C. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ

ASESOR ADJUNTO

DR. EN C. ENRIQUE MORALES AVILA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

NOVIEMBRE 2017

AGRADECIMIENTOS

*Mi agradecimiento se dirige a quien ha moldeado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a **DIOS**, el que en todo momento está conmigo, ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía el destino de mi vida.*

*A mis padres **Amalia** y **Francisco**, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes, me formaron con reglas y algunas libertades, pero lo más importante me motivaron constantemente a alcanzar mis anhelos, y que a pesar de los tropiezos uno debe levantarse, sacudirse y seguir adelante.*

*A mi abuelito **Antonino** (Q.D.G.) por enseñarme el valor de la humildad y a mi abuelita **Paula** por estar al pendiente durante todo este tiempo.*

*A **Alejandro**, que a pesar de mis malos ratos no dejó de impulsarme, para lograr este sueño tan anhelado.*

A toda mi familia por su apoyo en algún momento de mi vida, exhortándome a terminar.

*Al **Dr. Jonnathan** por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y gran conocimiento, también por haberme facilitado los medios para llevar a cabo las actividades y por su gran paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis. Muchas gracias Profesor.*

*Al **Dr. Enrique** por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis.*

A mis profesores de clase, amigos y compañeros que me apoyaron en algún momento para crecer profesionalmente, pues cada día aprendía algo nuevo con ellos.

A las personas que integraron el Jurado de Evaluación Profesional, por sus valiosas aportaciones en éste trabajo de investigación.

*Al proyecto **PRODEP: DSA/103.5/16/10569***

*Por eso pedí, y se me concedió la prudencia,
supliqué y me vino el Espíritu de la Sabiduría.
La aprendí con sencillez, y la comuniqué sin envidia,
no quiero guardar para mí, sus riquezas.
Sabiduría 7:7,13*

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de tablas.....	7
Índice de figuras	8
Abreviaturas	9
1. Resumen.....	10
2. Marco teórico.....	11
2.1 Introducción	11
2.2 Antecedentes.....	12
2.3 Características del vector	13
2.4 Clasificación y estructura del DENV	14
2.4.1 Proteínas estructurales.....	14
2.4.2 Proteínas No estructurales.....	15
2.5 Replicación viral.....	15
2.5.1 Entrada, fusión y denudación de la partícula	16
2.5.2 Replicación del RNA viral.....	16
2.5.3 Ensamblaje, maduración y liberación del DENV	16
2.6 Patología	17
2.7 Clasificación del cuadro clínico del DENV	18
2.8 Manifestaciones clínicas	20
2.8.1 Fase febril	20
2.8.2 Fase crítica	21
2.8.3 Fase de recuperación	21
2.9 Inmunidad	22
2.10 Epidemiología.....	23
2.10.1 Panorama internacional.	23
2.10.2 Panorama nacional	25
2.10.3 Panorama Estatal.....	26
2.11 Colecta de muestras para el diagnóstico del dengue.....	28
2.12 Técnicas de identificación de DENV	28
2.12.1 Anticuerpo	28

2.12.2 Antígeno.....	29
2.13 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	29
2.13.1 ELISA competitivo	30
2.13.2 ELISA no competitivo	30
2.14 Aislamiento e identificación del virus.....	31
2.15 Fundamento de la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero humano mediante el método inmunoenzimático.....	32
2.16 Fundamento de la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra en antígeno del dengue en suero.....	32
3. Planteamiento del problema	33
4. Justificación	34
5. Hipótesis	35
6. Objetivo General.....	35
7. Objetivos Específicos.....	35
8. Metodología.....	36
8.1 Diseño metodológico.....	36
8.2 Diseño de estudio	36
8.3 Material y métodos	37
8.4 Universo de trabajo	37
8.5 Tipo de muestreo	37
8.6 Tamaño de muestra	37
8.7 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	38
8.8 Operacionalización de variables.....	38
8.9 Procedimientos.....	39
8.9.1 Identificación cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero o en el plasma humano mediante el método inmunoenzimático. 39	
8.9.2 Identificación cualitativa de anticuerpos IgM contra en antígeno del dengue en suero.....	41
8.10 Caracterización de la muestra objeto de estudio	43
8.10.1 Género	43
8.10.2 Edad	43
8.10.3 Desplazamiento en los últimos 30 días	43
8.10.4 Sintomatología posterior a la picadura de un mosquito	44
8.11 Determinación del porcentaje de positividad para Ag NS1 y de la IgM.....	44

9.	Consideraciones éticas.....	44
10.	Resultados.....	45
10.1	Control de calidad para la determinación de Ag NS1 del DENV	45
10.2	Control de calidad para la determinación de IgM para el DENV.....	46
10.3	Caracterización de la muestra para identificación de Ag NS1	48
10.4	Caracterización de la muestra para determinación de IgM.....	51
10.5	Tabla de datos y resultados.....	55
10.6	Determinación del porcentaje de positividad para Ag NS1.....	61
10.7	Determinación del porcentaje de positividad de la IgM para el DENV.....	61
11.	Discusión	62
12.	Conclusiones.....	67
13.	Perspectivas.....	69
14.	Recomendaciones.....	70
15.	Bibliografía.....	71
16.	Anexos	77
	Anexo 1. Hoja de recolección de datos	77
	Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado.....	78
	Anexo 3. Autorización para realizar toma de muestra en la Facultad de Química, UAEMex.....	80
	Anexo 4. Carta de aceptación del protocolo por parte del Comité de Ética para la Investigación del CICMED	81
	Anexo 5. Carta de aceptación de resumen para participar en el X Congreso Nacional de Virología 2017.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

No se encuentran entradas de índice.

Contenido	Página
Tabla 1: Casos de reportes de DENV en el continente Americano. SE número 52, 2016.....	24
Tabla 2: Operacionalización de variables.....	38
Tabla 3. Interpretación de resultados de acuerdo a la absorbancia para Ag NS1.....	40
Tabla 4. Interpretación de resultados de acuerdo con unidades Panbio para IgM.....	42
Tabla 5. Absorbancias del duplicado del calibrados para Ag NS1.....	45
Tabla 6. Obtención de la relación del control negativo y control positivo.....	46
Tabla 7. Absorbancia de los triplicados del calibrador.....	46
Tabla 8. Obtención del valor índice del triplicado de los controles positivo y negativo.....	47
Tabla 9. Caracterización de la muestra para Ag NS1 e IgM del DENV.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Estructura del DENV.....	14
Figura 2. Genoma del DENV.....	15
Figura 3. Ciclo replicativo del DENV.....	17
Figura 4. Diagrama de clasificación del DENV.....	20
Figura 5. Casos de reportes de DENV en diferentes subregiones del continente Americano.....	24
Figura 6. Casos de DENV, según región geográfica de la República Mexicana....	25
Figura 7. Reportes de DENV por Jurisdicción Sanitaria en el Estado de México...	26
Figura 8-9. Análisis estadístico de DENV en el Estado de México de 2011-2016	27
Figura 10. Diagrama de flujo para la identificación de Ag NS1 e IgM	36
Figura 11. Diagrama de flujo para la detección de Ag NS1 del DENV.....	39
Figura 12. Diagrama de flujo para la detección de IgM para el DENV.....	41
Figura 13. Estados y Municipios a los que principalmente hay desplazamiento....	43
CARACTERIZACION PARA AgNS1	
Figura 14. Caracterización de la muestra según género.....	48
Figura 15. Caracterización de la muestra según edad.....	48
Figura 16. Caracterización de la muestra según desplazamiento.....	49
Figura 17. Caracterización de muestra según el lugar de desplazamiento.....	49
Figura 18. Caracterización de la muestra según sintomatología.....	50
Figura 19. Caracterización de la muestra según tipo de sintomatología.....	50
CARACTERIZACION PARA IgM	
Figura 20. Caracterización de la muestra según género.....	51
Figura 21. Caracterización de la muestra según edad.....	52
Figura 22. Caracterización de muestra según el lugar de desplazamiento.....	52
Figura 23. Caracterización de la muestra según sintomatología.....	53
Figura 24. Caracterización de la muestra según tipo de sintomatología.....	53
Figura 25. Caracterización de la muestra según antecedentes de DENV.....	54

ABREVIATURAS

DENV: Virus del Dengue

Proteína E: Envoltura

Proteína M: Membrana

Proteína C: Cápside

ORF: Open Reading Frame

DH: Dengue Hemorrágico

SSD: Síndrome de Choque por Dengue

CD: Células dendríticas

AcM: Anticuerpo Monoclonal

NK: Natural Killer

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

MHC: Complejo Mayor de
Histocompatibilidad

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific
Intercellular Adhesion Molecule-3
Grabign Non Integrin

BiP: Binding Protein

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent
Assay

IgM: Inmunoglobulina M

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

NS1: Proteína No Estructural 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

CDC: Centers for Disease Control and
Prevention

OPS: Organización Panamericana de la
Salud

DG: Dengue Grave

SE: Semana Epidemiológica

ARN: Ácido Ribonucleico

Estudio DENCO

IFN: Interferón

IL: Interleucina

COFEPRIS: Comisión Federal para la
Protección contra Riesgos Sanitarios.

InDRE: Instituto de Diagnóstico y
Referencia de Epidemiológicos.

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las principales enfermedades virales de carácter epidémico. Constituye la arbovirosis más importante a nivel mundial en morbilidad, mortalidad, en México, es una de las principales enfermedades transmitidas por vector¹.

En el presente trabajo se realizó una identificación de antígeno NS1 para el virus de Dengue mediante un método inmunoenzimático en una etapa de tipo sándwich, para la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 y la detección de IgM contra antígenos del Dengue en suero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 60 muestras para la detección del antígeno NS1 para DENV y 68 muestras para la detección de inmunoglobulina M mediante ELISA.

RESULTADOS

En el análisis de detección del Antígeno NS1 las 60 muestras procesadas mediante ELISA fueron negativas; el 35.3% de las 68 muestras analizadas para la detección de IgM resultaron positivas. Las cifras muestran que del grupo de personas positivas a la IgM, al menos el 83.3% presenta rash/erupción, el 8.3% además de sentir rash/erupción también presenta petequias y finalmente el 8.4% restante presenta cefalea, fiebre y rash/erupción, el 58.4% se traslada al sur de la República Mexicana, principalmente a Estados considerados zonas endémicas del DENV, como son Guerrero, Michoacán y Veracruz, y a algunas comunidades del Estado de México, principalmente, Valle de Bravo, Acambay, Tejupilco y Malinalco. Amatepec y Villa del Carbón.

CONCLUSIONES

Este estudio mostró que los principales factores de exposición para la IgM positiva son haber viajado a zonas endémicas de la República Mexicana y que el mosquito del género *Aedes* que transmite el virus del Dengue se está adaptando a nuevas alturas debido a la positividad presentada en las zonas del estado de México donde no se había presentado, lo que constituye un serio problema para la salud en México.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las principales enfermedades virales de carácter epidémico que se presenta en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Constituye la arbovirosis más importante a nivel mundial en morbilidad, mortalidad, en México, es una de las principales enfermedades transmitidas por vector, y en los últimos diez años la transmisión ha aumentado de manera predominante en zonas urbanas y semiurbanas y se ha convertido en un importante problema de salud pública.^{1,2} El agente etiológico del dengue es un virus del género *flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. El dengue es transmitido exclusivamente por la picadura de las hembras de los mosquitos *Aedes aegypti*. Las infecciones pueden cursar asintomáticas, como un cuadro febril inespecífico o presentarse clínicamente con inicio súbito de fiebre, cefalea, dolor retroocular, mialgias y artralgias, en algunos casos con eritema maculopapular o escarlatiniforme al tercero o cuarto día del inicio de la fiebre; eventualmente puede haber diarrea, náuseas y tos. Ocasionalmente se presentan hemorragias leves como epistaxis o gingivorragias.³

En las Américas el dengue se encuentra ampliamente distribuido. Países como Brasil y Ecuador poseen zonas endémicas en donde la infección es permanente. En 1980, los reportes de la infección por DENV estaban limitados a la zona sur de México, Puerto Rico, Honduras, Colombia y Venezuela. Sin embargo, para 1992, la infección abarcaba, además, El Salvador, Nicaragua, Perú, Brasil y Paraguay; para 2002 los reportes de infecciones activas tuvieron lugar en la mayor parte del continente abarcando desde México hasta toda la región centroamericana y Sudamérica, con una incidencia de más de 1 millón de casos.⁴

El dengue es un problema creciente para la Salud Pública mundial, debido a varios factores: el cambio climático, el aumento de la población mundial en áreas urbanas de ocurrencia rápida y desorganizada, la insuficiente provisión de agua potable que obliga a su almacenamiento en recipientes caseros habitualmente descubiertos, la inadecuada recolección de residuos y la gran producción de recipientes descartables que sirven como criaderos de mosquitos al igual que los neumáticos desechados. A esto se suman el aumento de viajes y migraciones, fallas en el control de los vectores eficaces para prevenir la enfermedad.⁵

2.2 ANTECEDENTES

Los virus son parásitos intracelulares estrictos, son los agentes infecciosos más pequeños (20-300 nm) de diámetro. El genoma está contenido en un solo tipo de ácido nucleico (RNA o DNA) y en cadenas únicas o dobles según el virus de que se trate. El ácido nucleico viral está rodeado de una capa de proteína que recibe el nombre de cápside. Los virus, llamados envueltos presentan además una cubierta lipoproteica denominada nucleocápside. Durante su ciclo replicativo, las partículas virales se ensamblan en el interior de la célula infectada y son liberadas por lisis celular o gemación para infectar a otras células.⁶

El dengue es una enfermedad antigua, endémica de los trópicos y subtropicales, su agente causal es un flavivirus, con cuatro serotipos distintos Denv-1, Denv-2, Denv-3 Y Denv-4, los cuales causan una respuesta diferente en el hospedero.

El origen del término dengue viene de la lengua Swahili "*ka dinga pepo*" que significa "golpe súbito causado por un espíritu maligno" y en castellano dengue, tratando de describir las molestias del paciente por las artralgias.⁷

El primer informe de dengue aparece en una enciclopedia médica de la Dinastía Jin (265-420) en la que se asocia el vuelo de insectos con "agua venenosa"; Benjamín Rush describe el dengue como "Fiebre rompehuesos" en 1778, y en 1779 la enfermedad fue identificada y nombrada como tal.⁷

Los primeros registros de su forma epidémica datan a finales del siglo XVIII en Asia, África y América. La primera de estas epidemias descrita en la historia humana reciente sucedió en Filadelfia en 1780. Los principales brotes epidémicos en América se originaron en las islas del Caribe y Centroamérica durante la década de 1960 por la circulación del Denv-2, mientras que en Cuba esto ocurrió en 1981. En Perú se registraron brotes en 1990 y 1995 con la circulación del Denv-1, en México, los primeros reportes de dengue se registraron en 1941, cuando se notificaron 6,955 casos en toda la República.^{1,8}

En México se instrumentó en 1957, una campaña para la eliminación del vector, objetivo que se cumplió en 1963, cuando la Organización Panamericana de la Salud declaró su erradicación del país; esta condición solo pudo ser mantenida durante dos décadas, periodo tras el cual nuevamente se inició la infestación paulatina del territorio nacional. El patrón de diseminación en el país ha sido de Sur a Norte, a lo largo de los estados del sureste y el golfo hacia la mayoría de las entidades de la república, sobre todo aquellas que por sus características geográficas, demográficas y sociales propician la presencia del vector y, por

tanto, de la enfermedad. Durante los primeros años de la epidemia, los estudios virológicos mostraron únicamente la presencia del *denv-1* en los estados afectados; 10 años más tarde ya se habían identificado los serotipos 2 y 4 y en 1995 se detectó por primera vez el serotipo 3 en la frontera sur, en el Golfo de México y en el Norte del país.⁹

El dengue en los años recientes se le ha considerado la enfermedad transmitida por las hembras de los mosquitos *Aedes aegypti*, que afecta al mayor número de humanos, este padecimiento tiende a tornarse a cuadros más severos con episodios hemorrágicos con choque, presenta letalidad promedio del 5% en el ámbito mundial.¹⁰

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL VECTOR

Los virus llegan a las glándulas salivales del mosquito *Aedes*, donde se replican (período que dura 10 días). Luego, el mosquito inocula el virus a una persona al picarla. El insecto permanecerá infectado de por vida. No se documentó transmisión transovárica del virus durante la reproducción del mosquito. Como la hembra necesita proteínas que toma de la sangre humana para madurar los huevos, el mosquito se adaptó a entornos domiciliarios (cerca o dentro de la vivienda de las personas). El ciclo del huevo a larva y a pupa se inicia cuando se cubren de agua los recipientes naturales o artificiales donde deposita los huevos el mosquito. Según la humedad y la temperatura del ambiente, el ciclo se completa entre los 7 y los 13 días, y así surgen nuevos mosquitos.

El *Aedes* mide 5 mm y el rango de su recorrido de vuelo es de 200 a 400 metros; por ello permanece en el mismo lugar desde que nace, siempre que encuentre condiciones de alimento (personas), reposo y lugares para la oviposición. Es la hembra la que pica a los seres humanos para alimentarse, pero si estos se mueven o la espantan, se interrumpe la ingesta y volverá a picar varias veces a una persona o a diversas, hasta obtener entre 2 y 2,5 ml de sangre. Reposa por dos o tres días en lugares oscuros de las viviendas, sale en busca de criaderos artificiales o naturales para la ovipostura y deposita entre 10 y 100 huevos. De este modo, durante un mes de vida, con 10 ciclos de ovipostura, una sola hembra puede generar entre 300 y 750 mosquitos.¹¹

El vector 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 sotermia de 10 °C en verano, la altitud promedio en donde se encuentra es por debajo de los 1,200 msnm, aunque se ha registrado en alturas alrededor de los 2,400 metros sobre el nivel del mar en África.¹²

2.4 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL DENV

Se trata de un *arbovirus* con cuatro serotipos agrupados con base en criterios biológicos, inmunológicos y moleculares en Denv-1, Denv-2, Denv-3 y Denv-4. Las propiedades inmunológicas y antigénicas del virus están dadas por los antígenos estructurales (P, M, E) y no estructurales (NS1 a NS5).³ Los virus Denv-2 y Denv-3 son los más asociados con los casos graves, seguidos por Denv-1 y Denv-4.¹³ Recientemente, la detección de la proteína viral no estructural NS1 en el suero de los pacientes ha sido descrita como un método alternativo para el diagnóstico precoz de la infección. El antígeno NS1 se encuentra en la circulación desde el primero hasta el noveno día siguiente a la aparición de la fiebre, y los índices observados son comparables en las formas primarias y secundarias de infección.¹⁴

Presenta 50 nm de diámetro y su ARN de simple cadena y polaridad positiva se encuentra recubierto por la proteína C y las proteínas E y M, las mismas que se encuentran asociadas formando la bicapa lipídica que da lugar a las proyecciones que salen de la superficie de los viriones. Figura 1.

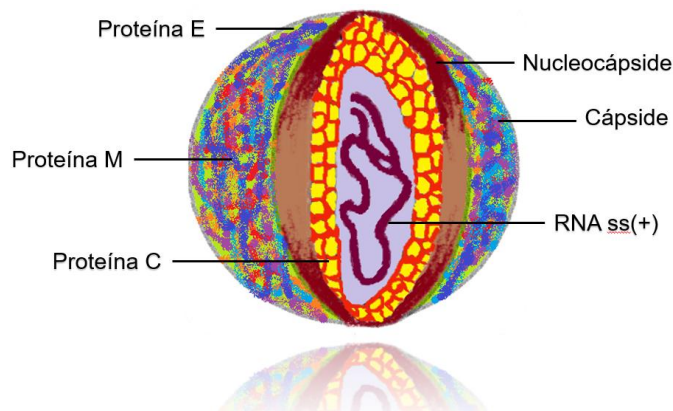


Figura 1. Estructura del DENV

2.4.1 Proteínas estructurales

Al igual que todos los flavivirus, el genoma del virus dengue, tiene por característica la presencia de una cap (cápside) en su extremo 5' y la carencia de un tracto poliadenilado en su extremo 3'. Presenta de igual forma un marco de lectura abierto (ORF: del inglés Open Reading Frame) que varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del virus, incluso entre un mismo serotipo. El genoma se compone por genes que codifican para siete proteínas no

estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y tres estructurales: de Cápside (C), de Membrana (M), y de Envoltura (E).¹⁶

2.4.2 Proteínas No estructurales

La proteína NS1 es una glicoproteína en el ensamblaje, maduración y transporte de los viriones maduros, forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas (*rafts*) de la membrana plasmática, se puede hallar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, la NS1 puede estimular al sistema inmunitario, contiene 2 señales del tipo Asn -X-Ser/Thr, usada para la adición de carbohidratos, estos sitios parecen estar conservados en todos los flavivirus.^{15, 17} La proteína NS2A puede actuar en el reclutamiento de las copias de RNA por la replicasa unida a la membrana. La proteína NS2B está asociada a la membrana, es un cofactor requerido para la función serina proteasa de la NS3. En su dominio central existe una región conservada constituida por 40 aminoácidos que es requerida para la actividad de la proteasa NS2B-NS3. La NS3 es una proteína trifuncional, con actividad proteasa, helicasa y RNA trifosfatasa. Las proteínas NS4A y NS4B, NS4A participan en la replicación del RNA anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. NS4B aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo.

16

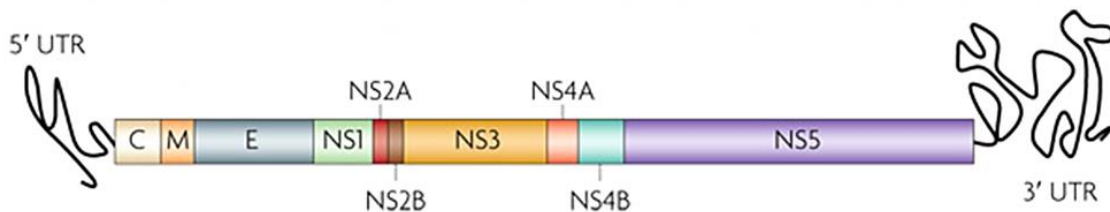


Figura 2. Genoma del DENV¹⁷

2.5 REPLICACIÓN VIRAL

Estudios in vitro han demostrado que el DENV es capaz de infectar a un gran número de células humanas, entre las células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B y T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales. Sin embargo, in vivo solo se ha encontrado a monocitos macrófagos y células dendríticas como blancos primarios de las infecciones por DENV.¹⁸

2.5.1 Entrada, fusión y desnudación de la partícula

El primer paso de la infección requiere la interacción entre la partícula viral y receptores presentes en la superficie de la célula huésped, que llevan a la entrada del virión a través de una endocitosis mediada por receptores. La proteína viral responsable de esta unión es la glicoproteína E, mediante su dominio III localizado hacia su extremo carboxiterminal. La proteína E interactúa con el receptor para lamina LAMR1, la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin, CD201) o proteoglucanos como el heparán sulfato de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus.^{18,19}

Los proteoglucanos como el heparán sulfato, por su alta carga negativa, pueden actuar como receptor primario para favorecer el acercamiento de las partículas virales a la superficie celular, que facilitaran la interacción de la proteína E, para favorecer la endocitosis.¹⁹ La cubierta se funde con la membrana del endosoma.

2.5.2 Replicación del RNA viral

Al acidificarse el medio de la vesícula se libera la nucleocápside en el citoplasma, entonces, se inician los procesos de traducción y replicación del RNA. El RNA genómico viral del DENV es procesado en el retículo endoplásmico por proteasas celulares y la actividad NS3pro, que libera de forma ordenada a las tres proteínas estructurales (C, M y E) y las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral.¹⁸

Durante la traducción, el polipéptido recién sintetizado es acompañado por las proteínas chaperonas BiP, calnexina y calreticulina; luego, cada una de las proteínas virales se organiza en la membrana del retículo endoplásmico y es procesada por proteasas como la furina, la signalasa o la NS3Pro.²⁰

2.5.3 Ensamblaje, maduración y liberación del DENV

El proceso de ensamblaje de las partículas del DENV sucede en distensiones del retículo endoplásmico denominadas membranas “convolutas” (convolute), donde ocurre de forma simultánea la traducción de la proteína y el ensamblaje del virus.¹⁹

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocapside en el citoplasma de las células infectadas por el virus del dengue, se acumula proteína C en la superficie de cuerpos lípidicos²¹ luego se asocian las proteínas prM/M y E, posteriormente se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda;

esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones cis y trans del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr.

Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula sensible e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula.¹⁹ Como se observa en la figura 3.

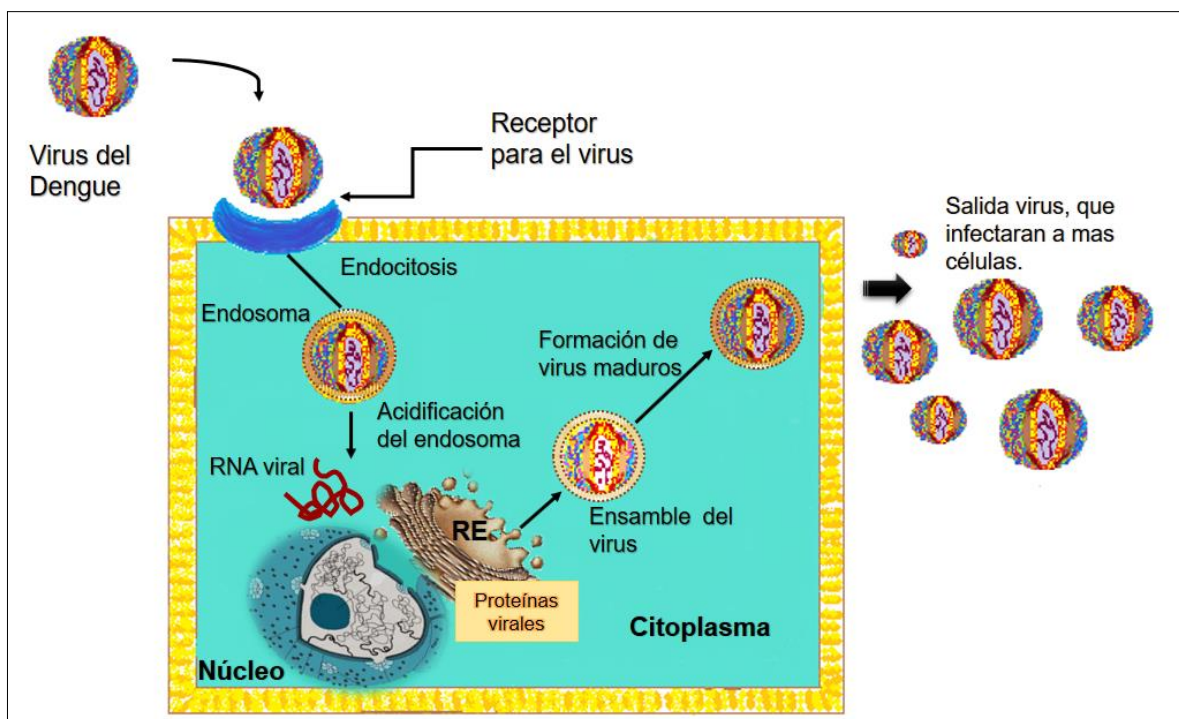


Figura 3. Ciclo replicativo del Virus del Dengue (Tomada y modificada de Nature reviews (2011). Immunology)²²

2.6 PATOLOGÍA

En la infección por dengue se reconocen cuatro fases: la fase de incubación, que dura de tres a 10 días; la fase febril, que se mantiene de dos a siete días; la fase crítica (fuga plasmática), que se presenta entre el tercer y el séptimo día del inicio de la fiebre; y la fase de recuperación (reabsorción de líquidos), la cual ocurre entre el séptimo y el décimo día.

La mayoría de los enfermos desarrolla la forma leve, o fiebre por dengue, y algunos la forma hemorrágica, que puede llevar a la muerte cuando se acompaña del síndrome de choque por dengue.

Existen diversos factores que ocasionan el desarrollo de formas graves de la enfermedad:

- Del huésped: edad, estado nutricional, factores genéticos e inmunológicos.
- Del virus: serotipo y virulencia de la cepa.
- Epidemiológicos: vector de transmisión e intervalo entre las infecciones.

Se ha documentado que con mayor frecuencia los individuos que sufren las formas graves han tenido una infección anterior por un serotipo diferente del virus. Los virus Denv-2 y Denv-3 son los más asociados con los casos graves, seguidos por Denv-1 y Denv-4.

2.7 CLASIFICACIÓN DEL CUADRO CLÍNICO DEL DENV

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2009, existen cuatro cuadros clínicos, entre los que destacan el dengue grave y el no grave.

1. Dengue asintomático.
2. Fiebre indiferenciada: se caracteriza por fiebre, odinofagia, cefalea y rinorrea.
3. Dengue no grave (fiebre por dengue, antes llamado dengue clásico):
 - Sin signos de alarma (Grupo A).
 - Con signos de alarma (Grupo B).
4. Dengue grave (fiebre hemorrágica por dengue) (Grupo C). Se caracteriza por uno o más de los siguientes síntomas:
 - Manifestaciones de fuga plasmática.
 - a) Síndrome de choque por dengue (presión diferencial ≤ 20 mm Hg o bien, taquicardia y manifestaciones cutáneas de vasoconstricción periférica).
 - b) Acumulación de líquidos con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA), derrame pleural o ascitis.
 - c) Hemoconcentración: hematocrito elevado o en aumento progresivo.
 - Hemorragia grave.
 - Afección orgánica grave.

- a) Afección hepática (ictericia, insuficiencia hepática aguda, encefalopatía) o gastrointestinal (vómito persistente, dolor abdominal en aumento progresivo o intenso).
- b) Alteración del estado de alerta y manifestaciones neurológicas (letargia, inquietud, coma, crisis convulsivas; encefalitis).
- c) Afección cardíaca (cardiomiopatía), renal (insuficiencia renal aguda) o de otros órganos.

Esta clasificación tiene valor pronóstico y, por lo tanto, utilidad en la toma de decisiones para el tratamiento. ^{24,25}

La clasificación recomendada por la Organización Mundial de la Salud en el 2009 es la llamada clasificación revisada, la cual surgió a partir de los resultados del estudio DENCO, que incluyó casi 2.000 casos confirmados de dengue de ocho países y dos continentes, y establece dos formas de la enfermedad: dengue y dengue grave.²⁶ Figura 4

Con el antecedente de fiebre, la fase crítica del dengue, en el dengue grave, aparece con:

- Descenso súbito de la temperatura.
- Baja de la cuenta de plaquetas ($100,000/\text{mm}^3$ o menos).
- La fuga plasmática, caracterizada por la presencia de hemoconcentración (elevación del hematocrito), con o sin evidencia de derrame pleural, ascitis o hipoalbuminemia.
- Diferentes grados de alteración hemodinámica, en el inicio del choque por dengue.

Tendencia a la hemorragia, como:

- Petequias, equimosis, púrpura.
- Hemorragias visibles en mucosas, en el tracto respiratorio o en sitios de inyecciones.
- Prueba de torniquete positiva.
- Daño orgánico en alguno de los diversos sistemas y aparatos, destacando: hepático, renal, cardíaco y neurológico. ²⁵

El dengue es una enfermedad sistémica y muy dinámica, en la que en pocas horas un paciente puede pasar de un cuadro leve a uno grave.

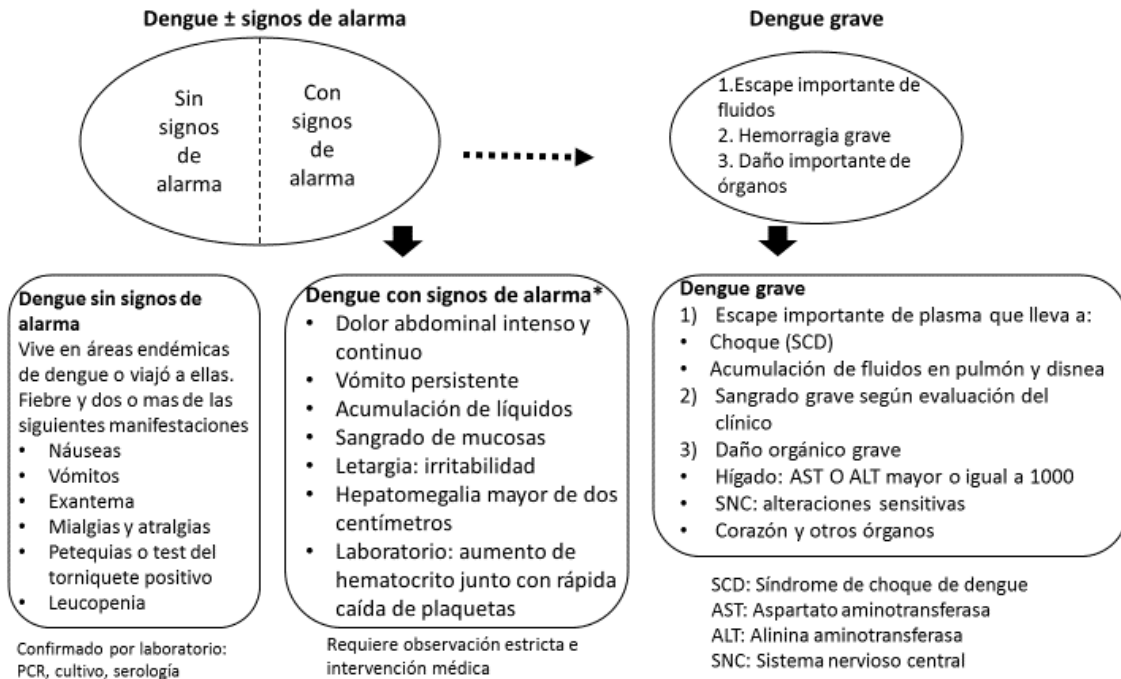


Figura 4: Diagrama de clasificación del dengue (Tomada y modificada de la OMS)

2.8 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Luego de un período de incubación promedio de 7 días, (rango entre 3 a 14 días), la enfermedad comienza bruscamente y evoluciona en 3 fases: febril, crítica y de recuperación.

2.8.1 Fase febril

Asociada a viremia (alta posibilidad de transmisión de la enfermedad) Inicio brusco Usualmente dura 2-7 días.

Manifestaciones clínicas: fiebre, dolor muscular y articular, cefalea, dolor retrorticular, astenia, exantema (<50% de los casos), prurito, y síntomas digestivos tales como: discreto dolor abdominal y, a veces, diarrea. Algunos pacientes tienen dolor y enrojecimiento faríngeo.

Prueba del lazo o test del torniquete positivo (evalúa fragilidad capilar, consiste en insuflar el manguito del tensiómetro a un punto medio entre presión sistólica y diastólica durante 5 minutos. La presencia de ≥ 20 petequias en un área de 2,5 x 2,5 cm se considera positiva).²⁷

2.8.2 Fase crítica

Generalmente dura 24 a 48 horas. En los casos graves, al inicio de la fase crítica generalmente ocurre leucopenia y luego un descenso rápido del recuento plaquetario, antes de la fuga plasmática. El grado de ésta varía; dependiendo de dicho grado y del volumen de líquidos administrados, pueden detectarse derrame pleural y ascitis, clínicamente o mediante estudios radiológicos o ultrasonográficos. La elevación del hematocrito generalmente refleja la gravedad de la fuga plasmática. El choque sobreviene cuando se pierde un volumen crítico de plasma, a través de la fuga; generalmente, esta situación va precedida de signos de alarma. Durante el choque, la temperatura puede ser subnormal. Si el periodo de choque se prolonga, la hipoperfusión consecuyente de órganos vitales resulta en falla orgánica progresiva, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. Esto, a su vez, lleva a hemorragia grave que hace disminuir el hematocrito y puede observarse entonces un aumento en la cuenta de leucocitos. La falla orgánica grave, como la hepatitis, la encefalitis o la miocarditis, y/o la hemorragia grave, pueden desarrollarse también sin manifestaciones evidentes de fuga plasmática o de choque.

2.8.3 Fase de recuperación

Si el paciente sobrevive a las 24 a 48 horas de la fase crítica, durante la fase de recuperación o convalecencia tiene lugar una reabsorción gradual de líquido del compartimiento extravascular, que se traduce en:

- Mejoría del bienestar general.
- Retorno del apetito.
- Desaparición de los síntomas gastrointestinales.
- Estabilización hemodinámica.
- Recuperación de la diuresis.
- Bradicardia.
- Cambios electrocardiográficos.
- Estabilización o disminución del hematocrito.
- Elevación del recuento de leucocitos (temprana)
- Recuperación del recuento plaquetario (tardía).
- Dificultad respiratoria por derrame pleural masivo, ascitis masiva, si se administraron demasiados líquidos, en cualquier fase.

- Edema pulmonar o insuficiencia cardiaca congestiva, si se administraron líquidos excesivos en la fase crítica o de recuperación. ²³

2.9 INMUNIDAD

La respuesta inmune innata o inespecífica y la adaptativa o específica, juegan un rol fundamental en la respuesta antiviral. Estudios recientes sugieren un papel fundamental de componentes celulares y moleculares del sistema inmune innato para la activación de la respuesta adaptativa. Los componentes celulares de la inmunidad innata más relevantes en la respuesta antiviral son las células dendríticas (CD), las células asesinas naturales y principalmente los macrófagos, los cuales controlan la fase inicial de la infección viral.

La participación conjunta de estos tipos celulares con los componentes humorales del sistema innato como el sistema complemento, el papel inmunorregulador de los interferones y otras citoquinas, como TNF- α , interleuquina-6 (IL-6), IL-10 e IL-8, permiten el desencadenamiento de la respuesta adaptativa antiviral. Elevados niveles de IFN- α y IFN- γ sugieren una respuesta protectora del hospedero contra el virus, así como bajos niveles de IFN- γ pueden reflejar una inadecuada respuesta. La respuesta inmunológica del huésped puede ser protectora y conducir a la curación o patología, expresada por una “desregulación” que se caracteriza por una producción excesiva de citoquinas, así como cambio de la respuesta tipo Th1 a Th2 e inversión del índice CD4 / CD8. ²⁴

El IFN α/β secretado por las células infectadas con virus activa señales de advertencia a las células adyacentes que está ocurriendo una infección, así como una inducción autocrina de respuestas antivirales celulares. IFN α/β es un poderoso inhibidor de la infección por DENV ²⁸

Las células NK censan la presencia de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I en la superficie celular. La carencia o una expresión baja de las mismas induce la eliminación de la célula por una de estas dos vías: la vía secretora, que es dependiente de granzimas, y la vía no secretora, que depende de Fas (CD95), que son además señales de activación de la apoptosis. ²⁹

Adicionalmente, al activarse las células NK producen IFN- γ , que es también un efector importante de la respuesta antiviral y que participa en la activación de los macrófagos. Los linfocitos T CD4+ activados por los péptidos presentados en moléculas de clase II del MHC proliferan y secretan citocinas que polarizan la respuesta hacia las células efectoras más adecuadas para la eliminación del patógeno. ²⁹

Los linfocitos T CD8+ específicas de DENV responden produciendo IFN- γ y factor de necrosis tumoral TNF- α , expresando en la superficie celular CD107a marcador de desgranulación, y exhibe actividad citotóxica *in vivo*.³⁰

La respuesta mediada por IgG hacia la infección por DENV puede perdurar durante décadas. Los anticuerpos generados son específicos, pero en las formas graves se presenta reactividad cruzada con los diferentes serotipos. La formación de complejos inmunes circulantes pudiera tener un papel importante en la inmunopatogénesis viral por un mecanismo de hipersensibilidad tipo III. Los altos niveles de TNF- α se han relacionado consistentemente con la gravedad de la enfermedad, constituyendo tal vez uno de los principales elementos inmunopatogénicos del dengue. Producen aumento de la permeabilidad vascular y pueden inducir la apoptosis de las células endoteliales.²⁹

2.10 EPIDEMIOLOGÍA

2.10.1 Panorama internacional.

En el año 2016, al cierre de la semana epidemiológica (SE) número 52, se han contabilizado 2,338,848 casos de dengue, con una incidencia promedio de 244.8 casos/100,000 habitantes; de los cuales 433,716 casos han sido confirmados en todo el continente, para una incidencia promedio de 45.4 casos/100,000 habitantes como se observa en la tabla 1.

El mayor número de casos graves se observan en las subregiones de Centroamérica y México, Andina y Cono Sur, con un total de 3601 registros de casos confirmados, sin embargo, la mayoría de los casos graves se observan en la subregión del Cono Sur quien aporta el 63.5% (655 muertes) de las defunciones por esta enfermedad, la mayoría ocurridas en Brasil, seguida de la subregión Andina (26.6%, 275 muertes), en donde Colombia y Perú aportan la mayor cantidad de fallecidos en esa subregión.³¹ Figura 5

Los países con mayor incidencia se encuentran las Islas Turcas y Caicos con 830 casos/100,000 habitantes, seguido de San Bartolomé con 662.3 casos/ 100,000 habitantes e Islas Vírgenes Británicas con 303 casos/100,000 habitantes, México ocupa el lugar número 21 teniendo una incidencia de 14.2 casos/100,000 habitantes de 51 países del continente Americano.³²

SUBREGIÓN	CONFIRMADOS	% CONFIRMADOS	Dengue Grave	% Dengue Grave	DEFUNCIONES	% DEFUNCIONES
Norte América	764	0.2	0	0.0	0	0.0
Centroamérica y México	26497	6.1	1330	31.1	63	6.1
Andina	86399	19.9	1379	32.3	275	26.6
Cono Sur	316246	72.9	892	20.9	655	63.5
Caribe Hispano	1994	0.5	670	15.7	39	3.8
Caribe Inglés y Francés	1816	0.4	3	0.1	0	0.0
Total	433716	100.0	4274	100.0	1032	100.0

Tabla 1: Casos de reportes de DENV en el continente Americano. Semana Epidemiológica número 52

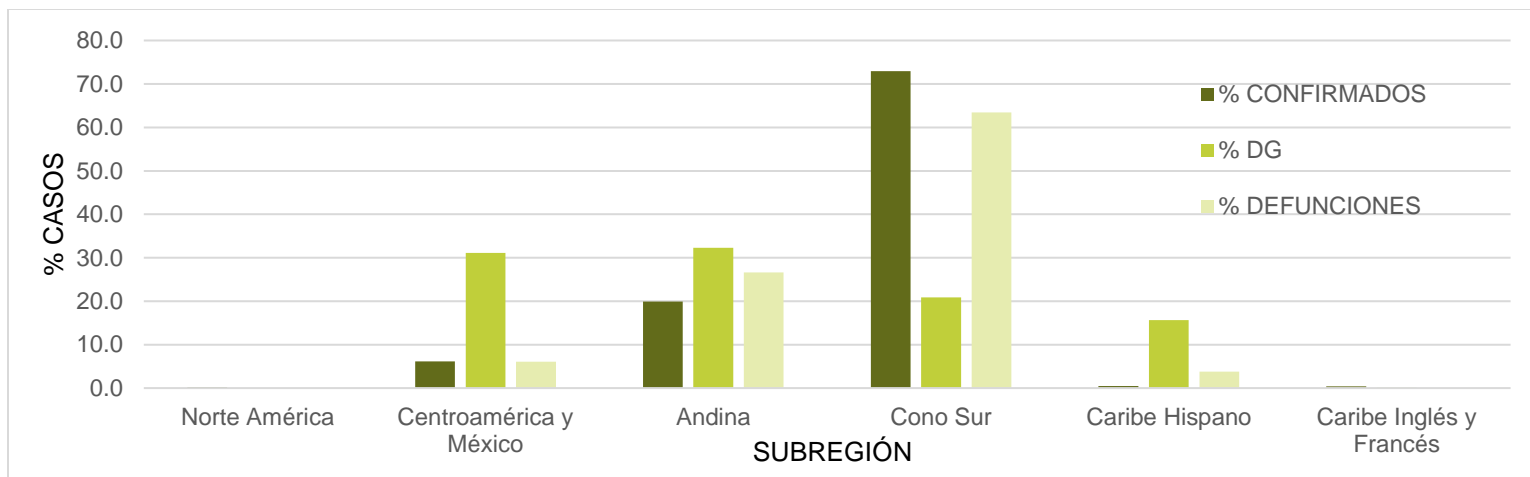


Figura 5: Casos de reportes de DENV en la diferentes Subregiones del continente Americano. Semana Epidemiológica número 52

2.10.2 Panorama nacional

En la actualidad el dengue representa un problema importante de salud pública en nuestro país. Con el control de *Aedes aegypti* en la década de los años 60, México estuvo libre de dengue hasta 1978 cuando fue invadido nuevamente por este vector. Desde entonces la enfermedad presenta un patrón anual, con picos en los meses de lluvia.

En el transcurso del 2016, la mayor parte de los casos reportados se concentró en Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nuevo León y Veracruz, sin embargo, la mayor incidencia por población se encuentra en los estados de Guerrero, Durango, Colima, Morelos y Michoacán en orden decreciente con arriba de 30 casos/100,000 habitantes. El estado de México tuvo un reporte total de casos confirmados de dengue de 675 de los cuales 13 dengue grave, quedando con una incidencia de 3.94 casos/100,000 habitantes.³³ En la figura 6 se muestran las zonas geográficas con mayor porcentaje de reporte de dengue se encuentran Occidente, Noreste, Suroeste y Oriente.

De acuerdo con los datos arrojados del boletín epidemiológico de la semana 52 de enfermedades transmisibles la incidencia de dengue es mayor en mujeres que en hombres.³³

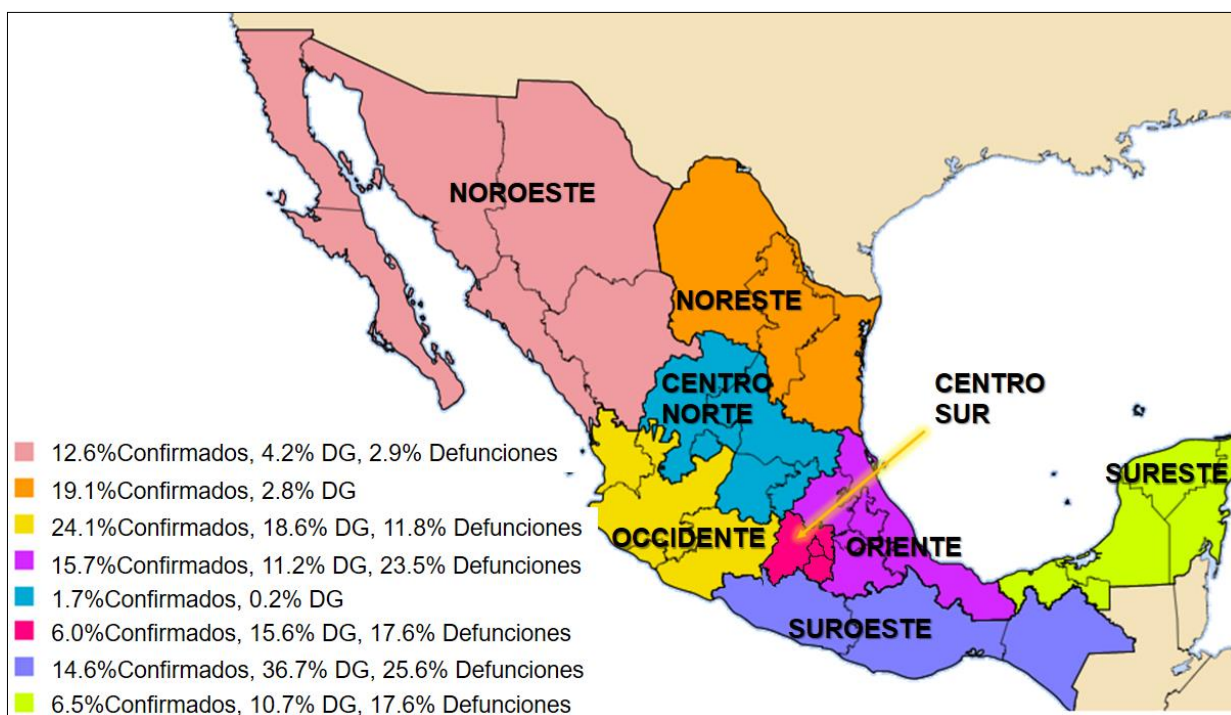


Figura 6. Casos de DENV, según Región geográfica en la República Mexicana

2.10.3 Panorama Estatal

De acuerdo con los registros del Boletín Epidemiológico del Estado de México de la semana 52, en la figura 7 se muestra como el mayor porcentaje de confirmaciones de dengue se conglomera en la jurisdicción sanitaria de Tejupilco con 84.2% casos; de los 4 casos de Dengue Grave, 3 son de esta Jurisdicción y 1 reporte en la Jurisdicción Toluca. Las jurisdicciones que no tienen reporte de dengue son Jilotepec, Tenango del Valle y Teotihuacán.^{34,35}

En un análisis estadístico del número de casos de dengue reportados en el Estado de México se observa un aumento a partir de año 2012 en más del 50%, llegando a reportar 248 casos anuales de Dengue sin signos de alarma, en el 2013 se observa un aumento del 60%, manteniéndose hasta el año en curso como se observa en la figura 8. Con relación al dengue Hemorrágico este se ha mantenido en menos de 10 reportes anuales. Figura 7

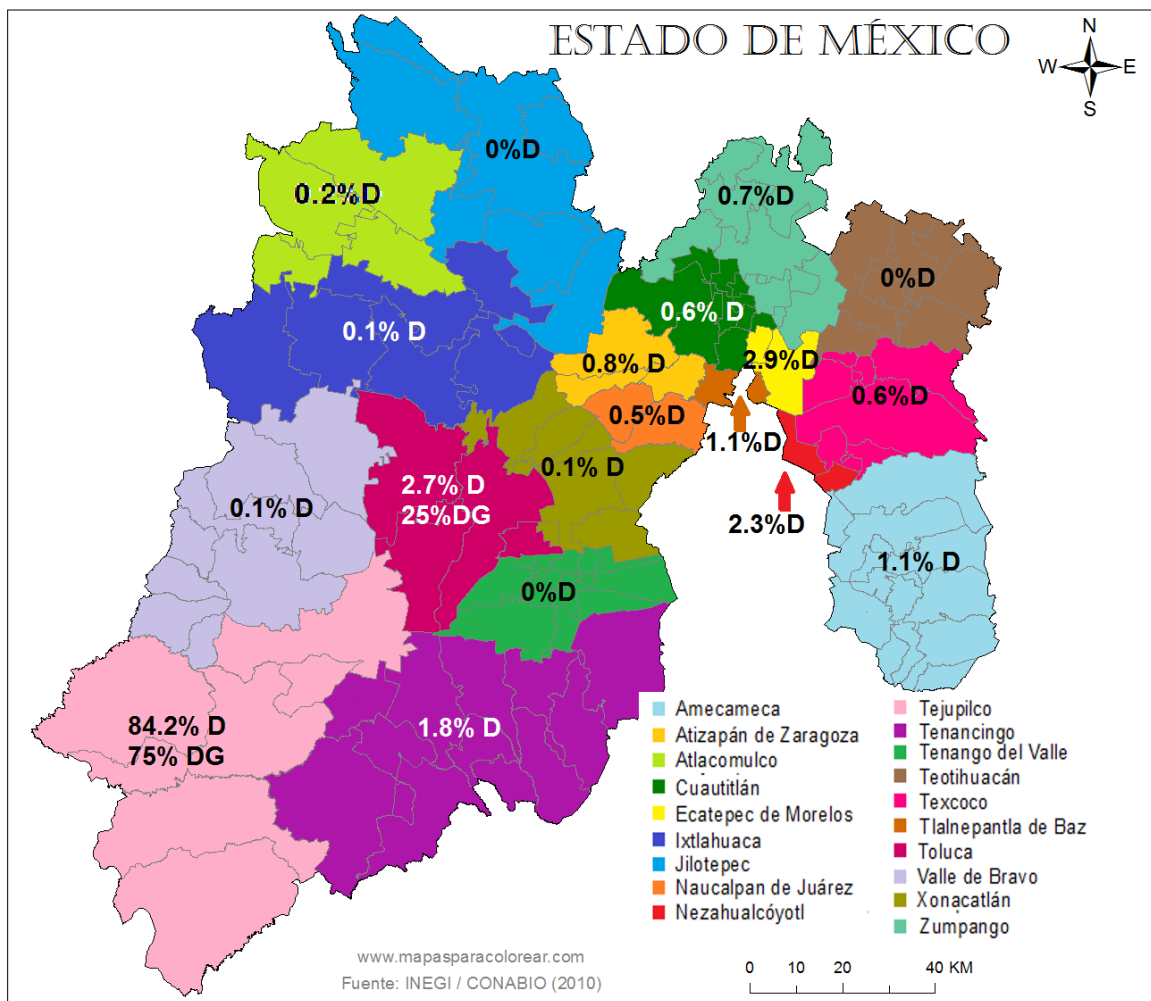


Figura 7. Reportes de DENV por Jurisdicción Sanitaria en el Estado de México³⁴

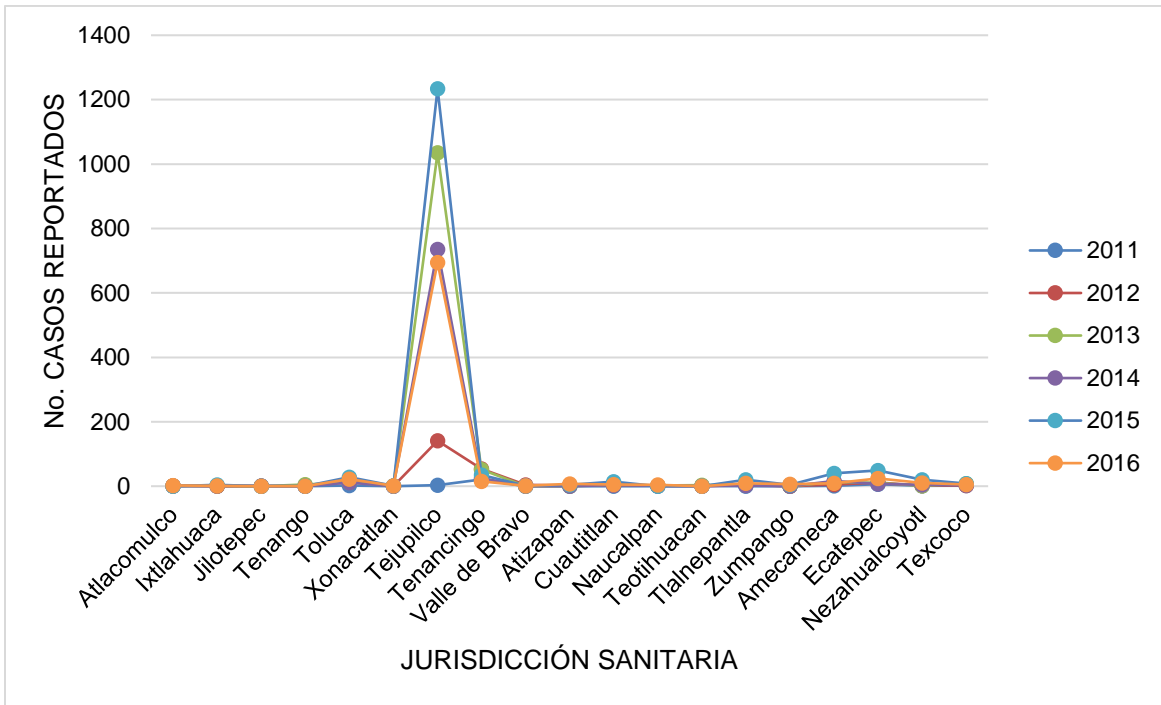


FIGURA 8. Reporte de casos de dengue no grave por Jurisdicción Sanitaria en el Estado de México 2011-2016.

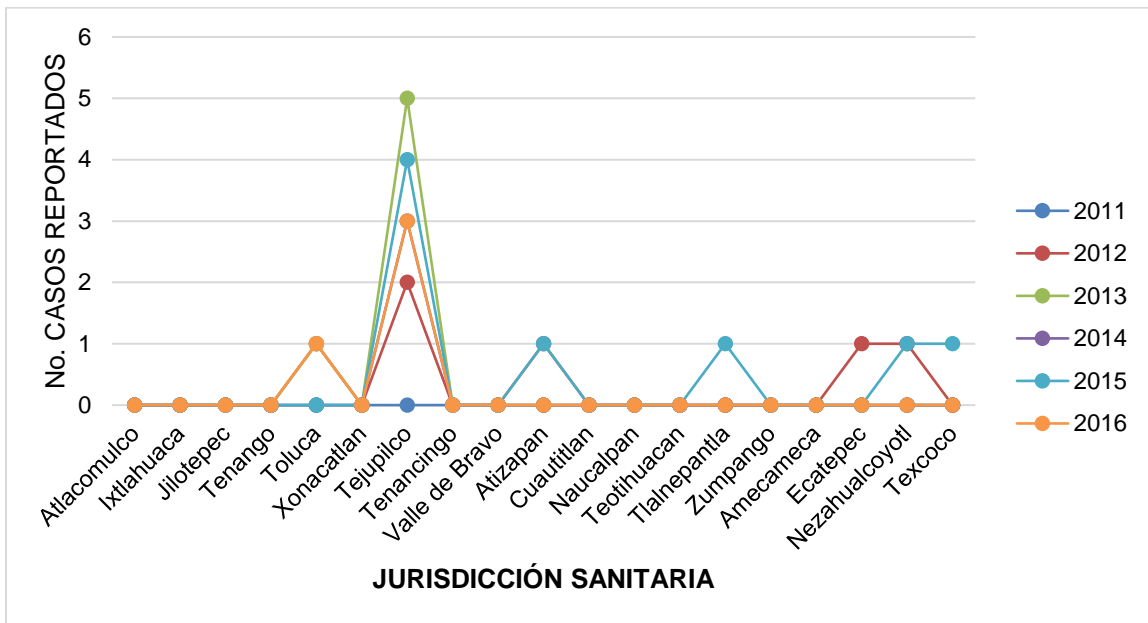


Figura 9. Reporte de casos de dengue grave por Jurisdicción Sanitaria en el Estado de México 2011-2016.

2.11 COLECTA DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DENGUE

Todos los especímenes deben recogerse observando precauciones universales en frascos estériles y rotularse cuidadosamente con los datos de identificación. Es conveniente emplear un modelo que incluya los siguientes aspectos:

- Nombre, apellidos
- Edad, sexo y etnicidad
- Dirección
- Fecha de comienzo de los síntomas (si existen)
- Fecha de toma de las muestras
- Datos clínicos y epidemiológicos del caso
- Impresión diagnóstica
- Tipo de muestra colectada

Todas las muestras deben ser rotuladas con el nombre del paciente y fecha de toma de la muestra y deben estar acompañadas por los datos anteriores.³⁶

2.12 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE DENV

2.12.1 Anticuerpo

Los anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas, son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.³⁷

Los anticuerpos son sintetizados por un tipo de leucocito denominado linfocito B. Existen distintas modalidades de anticuerpo, isotipos, basadas en la forma de cadena pesada que posean. Se conocen cinco clases diferentes de isotipos en mamíferos que desempeñan funciones diferentes, contribuyendo a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada distinto tipo de cuerpo extraño que encuentran.³⁸

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una pequeña región del ápice de la proteína es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno con un extremo ligeramente distinto. A esta parte de la proteína se la conoce como región hipervariable. Cada una de estas variantes se puede unir a una "diana" distinta, que es lo que se conoce como antígeno.³⁹

2.12.2 Antígeno

La respuesta inmune es la actuación integrada de un gran número de mecanismos heterogéneos de defensa contra sustancias y agentes extraños. En general, a las sustancias extrañas se las denomina como antígenos, y son ellos los que desencadenan en el organismo una serie de eventos celulares que provocan la producción de los mecanismos de defensa.⁴⁰

2.13 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La inmunoquímica cobra un gran impulso en las primeras décadas del siglo XX con los trabajos de Karl Landsteiner (1868-1943). Su primera contribución de importancia había sido la descripción, mediante reacciones de aglutinación, del sistema de antígenos naturales (ABCO) de los eritrocitos humanos (1901-1902), completada (en colaboración con Von Dungern y Hirzfeld), con las subdivisiones del grupo A y el estudio de su transmisión hereditaria.⁴⁰

Tiselius (1939) demostró que los anticuerpos constituyen la fracción gamma-globulínica del suero. En 1959, Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman presentan el modelo fundamental de las inmunoglobulinas (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) y su estructura química.

La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien unidas al anticuerpo. El ensayo de ELISA puede ser directo o no competitivo, constando de los siguientes pasos:

- a) Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar.
- b) Se añade la muestra con el antígeno.
- c) Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA, e indirecto o competitivo, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa.⁴⁰

2.13.1 ELISA competitivo

Los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad. En general, la sensibilidad y detectabilidad de estos ensayos es inferior a otros ELISA.⁴¹ La actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de la sustancia que hay que analizar en el espécimen.⁴²

2.13.2 ELISA no competitivo

La distinción entre los elementos libres y enlazados se logra usando diferentes conjugados, dirigidos contra distintos epítomos del antígeno, y el producto de una de las enzimas seleccionadas es el sustrato para la otra, pueden subdividirse de acuerdo con el inmunorreactante inmovilizado, serán, por tanto, ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos. Entre los primeros se destaca el principio de ensayo indirecto, en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado antiinmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato.⁴¹

2.13.2.1 ELISA directo: En este se fija el antígeno al soporte, se lava para eliminar los no fijados, luego se adicionan los anticuerpos marcados con la enzima para que reaccionen con el antígeno y que, solubilizado el complejo, se lava para eliminar anticuerpos que no reaccionaron y se agrega un sustrato específico para la enzima, al final se observa la coloración.

2.13.2.2 ELISA indirecto: En este la diferencia es que el elemento marcado por la enzima es un anti-anticuerpo que va a reaccionar con el anticuerpo, que reacciona junto al antígeno previamente fijado; finalmente agrega un sustrato específico para la enzima, se lava y se observa la coloración.

2.13.2.3 ELISA sándwich doble: Se fija al soporte el anticuerpo específicos del antígeno en el suero problema, posteriormente se añade el suero problema y los antígenos se fijan a los anticuerpo, luego se lava para eliminar elementos no fijados, posteriormente

se añaden anticuerpos conjugados con una enzima (de diferente epítipo a los previamente fijados) estos reaccionan con los antígenos de la muestra problema que se encuentran fijados a los otros anticuerpos, se lava la muestra y se añade un sustrato a la enzima marcadora y se observa el color visual o por colorimetría, se forma un sandwich, y la actividad enzimática unida en el complejo antígeno-anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se cuantifica.^{42,43}

2.14 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS

Para la técnica de aislamiento del virus, se debe obtener una muestra de suero tan pronto sea posible o dentro de los cinco días. Entre las técnicas se encuentran.

Aislamiento viral en ratones: la inoculación intracerebral de la muestra en ratones recién nacidos (1 ò 2 días) es el método tradicional y a su vez menos sensible, para el aislamiento del virus.

Aislamiento en células de cultivos y en mosquitos: líneas celulares de mamíferos como LLCMK2; BHK21, las células de mosquitos resultan mejores para el aislamiento por la sensibilidad, fáciles de multiplicar, mantener a temperatura ambiente, manteniéndose hasta 14 días sin necesidad de cambiarle el medio de cultivo, algunas de líneas celulares son AP61 obtenida de *A. pseudoscutellaris*; C6/36 de *Aedes albopictus*; Tra284; CLA-1 y AEGY-28 de *Aedes aegypti*, previamente obtenida a partir de tejidos embrionarios del vector.^{15,44}

Algunas líneas celulares de mamíferos son utilizadas para evaluación de la infectividad de algunas cepas del virus del dengue, ejemplo de ello se encuentran VERO línea celular proveniente de fibroblastos de riñón de mono verde africano y HepG2 línea celular de cáncer de hígado de humano.

El procedimiento con líneas celulares C6/36 consta de los siguientes pasos:

- a) Multiplicación de células C6/36
- b) Congelación de las células C6/36
- c) Descongelación
- d) Aislamiento viral
- e) Identificación viral por inmunofluorescencia¹⁵

2.15 Fundamento de la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero humano mediante el método inmunoenzimático.

Es un método inmunoenzimático en una etapa de tipo sándwich, para la detección del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero humano. La prueba utiliza anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) para su captura y revelación. Las muestras de pacientes y los patrones son incubados directa y simultáneamente con el conjugado durante 90 minutos a 37°C en las cúpulas de la microplaca sensibilizada por los AcM. En presencia de antígeno NS1 en la muestra, se forma un complejo inmune AcM-NS1-AcM/peroxidasa. Tras los lavados al final de la incubación, la presencia del complejo inmune es revelada mediante cromógeno. A los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática es interrumpida mediante la adición de una solución ácida. La densidad óptica obtenida a 450/620 nm es proporcional a la cantidad de antígeno NS1 presente en la muestra ensayada¹³

2.16 Fundamento de la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra en antígeno del dengue en suero

Cuando están presentes, los anticuerpos en suero de la clase IgM se unen a los anticuerpos anti-IgM humana ligados a la superficie de poliestireno de las tiras de prueba de los micropocillos. Los antígenos se producen usando un sistema de expresión en células de insecto y se inmunopurifican mediante un anticuerpo monoclonal específico. Se agrega un volumen igual de anticuerpo monoclonal (AcM) conjugado con HRP al antígeno diluido, lo que permite la formación de complejos de antígeno-MAb. La placa de la prueba se lava para retirar el suero residual y se agregan complejos de antígeno-MAb a la placa. Después del período de incubación, los micropocillos se lavan y se agrega un sistema de sustrato incoloro de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno (cromógeno de TMB). La enzima hidroliza el sustrato y el cromógeno se vuelve de color azul. Después de detener la reacción con ácido, la TMB se vuelve de color amarillo. Los cambios de color indican la presencia de anticuerpos IgM contra el dengue en la muestra de la prueba.³⁰

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es uno de los países catalogados según la OMS (Organización Mundial de la Salud) con prevalencia de dengue, debido principalmente a que la altitud y el clima favorecen el desarrollo y subsistencia del mosquito *Aedes aegypti*. Pero sobre todo en zonas tropicales y subtropicales de esta nación, lo que permite que la enfermedad del dengue tenga cierta prevalencia, considerándose como una enfermedad reemergente muy importante, principalmente en la forma hemorrágica

Estudios sobre el calentamiento global señalan que el *Aedes aegypti* ya se ha adaptado a vivir a mayor altura, lo que posibilita la existencia del dengue en zonas donde se consideraba que no aparecería. El dengue es un problema de salud pública que va tomando espacios antes considerados inadecuados para su desarrollo debido a que la limitación del vector para adaptarse a regiones por arriba de los 1200 m sobre el nivel del mar se ha visto rebasada, ya que el vector se encuentra bien establecido en diversas áreas rurales.

Es importante mencionar que debido a la facilidad con la que actualmente podemos trasladarnos de un lugar a otro a nivel nacional e internacional, sobre todo en zonas endémicas del mosquito, el riesgo de que la población se exponga a la picadura del mosquito es mayor y por tanto contraer la enfermedad del dengue también, además cabe destacar que parte de la población a estudiar proviene de zonas endémicas por lo que también se podría relacionar su continuo traslado a la ciudad de Toluca con un incremento en la incidencia de la enfermedad en la zona, por el tipo de transmisión paciente enfermo-vector-persona sana.

4. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años se ha prestado mucha atención a las enfermedades relacionadas con los virus, pues se tiene conocimiento que muchos de ellos son causantes del desarrollo de múltiples enfermedades que comprometen incluso la vida de muchas personas, a pesar de que carezcan de anatomía funcional y organización celular apoderándose como parásitos de las células animales y vegetales, son capaces de utilizar todo el mecanismo de replicación de estas células para subsistir, pasando inadvertidos en muchas ocasiones.

Algunos virus requieren de transmisores como es el caso del virus del dengue, el cual requiere del mosquito *Aedes aegypti*, que, mediante una picadura a los humanos pasa al organismo, dominando la maquinaria celular, y provocando así, no solo la activación del sistema inmune para atacarlo, sino también la muerte de muchas células y respuesta del organismo que pueden ser muy dañinos.

Los virus del dengue frecuentemente se transportan de un lugar a otro en personas que se infectan en visitas que hacen a regiones endémicas; el período de incubación puede ser de 3 a 14 días y la disponibilidad de transporte aéreo permite desplazamientos tan distantes de un estado a otro, o de un país a otro y hasta de un continente a otro en poco tiempo, si el destino es una área infestada por especies vectores, y un mosquito susceptible se alimenta de la sangre del viajero en el período virémico de la infección y sobreviviera al ciclo extrínseco del virus, muy probablemente marcaría el inicio de un brote.

Cabe destacar que en las comunidades rurales y del sur de la República Mexicana la presencia de mosquitos es mayor a comparación de una zona norte de, por tanto, se muestra principal interés en todas aquellas personas susceptibles a una picadura de mosquito, ya sea que vivan en lugares endémicos o que por situaciones de desplazamiento se hayan expuesto.

Es por ello por lo que se pretende hacer un estudio para evaluar la exposición al virus del dengue con alumnos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, mediante la cuantificación de anticuerpos IgM y la determinación del antígeno NS1 específicos para el virus del dengue.

5. HIPÓTESIS

Debido al continuo desplazamiento de personas que provienen de zonas endémicas del mosquito transmisor y a la exposición a la picadura del vector de los estudiantes de nivel superior de la UAEMéx al trasladarse a lugares endémicos, se encontrará presencia del Ag NS1 e IgM en el 5% de la población en estudio.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar el Antígeno NS1 del virus del Dengue y el anticuerpo IgM mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en suero de estudiantes de nivel superior de la UAEMéx.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la muestra, objeto de estudio en función al, lugar de residencia, frecuencia con la que viaja al sur del país.
- Determinar mediante un método inmunoenzimático tipo sándwich, de manera cualitativa o semicuantitativa el antígeno NS1 del virus del Dengue en suero.
- Determinar mediante prueba de ELISA de captura la presencia de IgM para el virus del dengue en suero.
- Determinar las causas, que promueven la exposición a una picadura de mosquito transmisor del Virus del Dengue.

8. METODOLOGÍA

8.1 DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó un estudio prospectivo transversal para identificar el Ag NS1 e IgM del Virus del Dengue en estudiantes de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de México, en un periodo de Abril a Junio de 2017 en el laboratorio de Investigación de la Facultad de Química. La muestra de estudio para detección de Ag NS1 del DENV fue de 60 sueros y para la detección de IgM para el DENV fue de 68 sueros. Figura 10.



Figura 10. Diagrama de flujo para la identificación de Ag NS1 e IgM

8.2 DISEÑO DE ESTUDIO

Los principales criterios de clasificación del estudio fueron:

- Finalidad del estudio
- Control de asignación de los factores de estudio: observacional
- Inicio de acción de la cronología de los hechos: prospectivo

8.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Se contó con el apoyo de los estudiantes de la Facultad de Química y de la autorización de parte de los directivos para el uso del laboratorio de investigación de la misma Facultad para el muestreo de 3 a 5 mililitros de sangre periférica, mediante punción venosa en tubo sin anticoagulante (tapón amarillo o rojo).

En el proceso de recolección de datos se utilizó el cuestionario (Anexo 1) y se proporcionó la Carta de Consentimiento Informado (Anexo 2). Para el análisis de la información se utilizó el programa Microsoft Excel Office 2007.

8.4 UNIVERSO DE TRABAJO

El presente estudio se realizó mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), para obtener los resultados se procedió a tomar una muestra de sangre periférica para la obtención de suero en estudiantes de nivel superior de la UAEMex, se emplearon dos kits comerciales uno para el Ac IgM específico para Dengue y Ag NS1 del DENV.

8.5 TIPO DE MUESTREO

Punción venosa, para la obtención de sangre periférica (5mL aproximadamente)

8.6 TAMAÑO DE MUESTRA

Estudio por conveniencia

El tamaño de la muestra será determinado de acuerdo con el número de pacientes que acudan a la toma de muestra, tomando como referencia aquellos que tengan un mayor índice de exposición a la picadura del mosquito transmisor del dengue el cual es aproximadamente del 5% y se obtendrá con la siguiente fórmula:

$$n = z^2 \cdot p \cdot q / e^2 \qquad n = (2.575)^2(0.5)(0.95) / (1)^2$$

Dónde: n= muestra, z= nivel de confianza (99% = 0.99, z= 2.575), p= probabilidad de que ocurra (0.5), q= probabilidad de que no ocurra (0.95), e= error máximo permitido (1%).

Se obtendrá con un intervalo de confianza del 99%.

Para el estudio se tomará en cuenta a los estudiantes de Nivel Superior de la UAEMex

8.7 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Alumnos de la Facultad de Química que se encuentren entre los 18 y 25 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Población infantil y población geriátrica.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN: Muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas.

8.8 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN
Edad	CUANTITATIVA	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.
Género	CUALITATIVA	Conjunto de las peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en masculinos y femeninos
Lugar de residencia	CUALITATIVA	Lugar en que la persona ha vivido de forma ininterrumpida durante la mayor parte del tiempo en un plazo de los últimos 12 meses
Lugar al que se desplazó	CUALITATIVA	Lugar en que la persona se trasladó por no más de 30 días.
VARIABLE DEPENDIENTE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN
IgM	CUANTITATIVA	Anticuerpo inmunoglobulina M específica para el virus del Dengue
NS1	CUANTITATIVA	Proteína no estructural 1 del Virus del Dengue.

Tabla 2: Variables dependientes e independientes

8.9 PROCEDIMIENTOS

8.9.1 Identificación cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en el suero o en el plasma humano mediante el método inmunoenzimático.

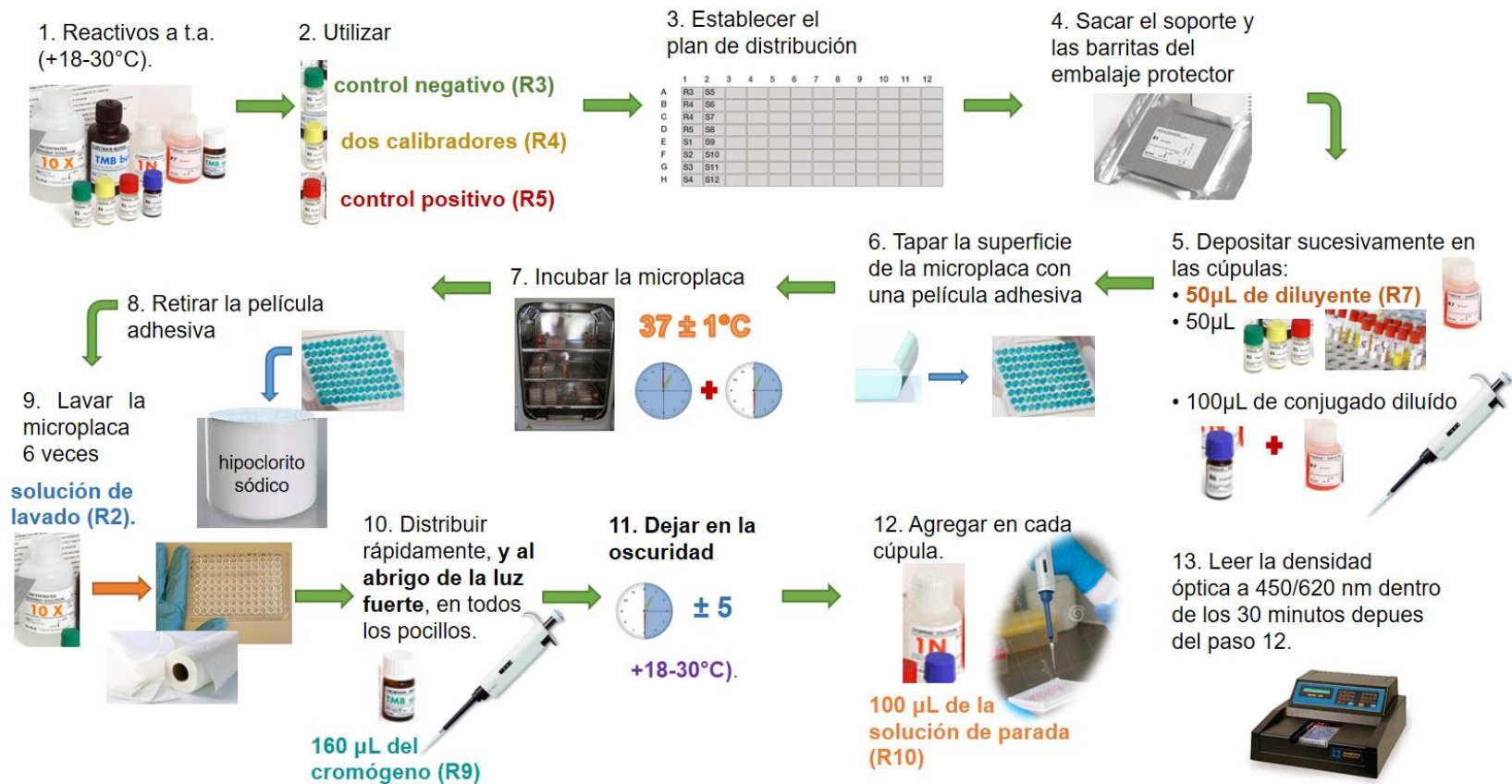


Figura 11. Diagrama de flujo para la identificación de Ag NS1 del DENV

8.9.2 Cálculo de la relación muestra para Ag NS1, control de calidad e interpretación

Los resultados se expresan en forma de Relación con la ayuda de la fórmula siguiente, en la que S es la densidad óptica (DO) obtenida para la muestra:

$$\bullet \text{ Relación Muestra} = S/CO$$

CONTROL DE CALIDAD: Para validar la manipulación, deberán cumplirse los siguientes criterios:

- Valor de densidad óptica= CO > 0.200
- Relación R3(Control Negativo) < 0.40
- Relación R5 (Control Positivo) > 1.50

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. Tabla 3.

RELACIÓN	RESULTADO
<0.50	Negativo
$0.50 \leq o < 1.00$	Equívoco
≥ 1.00	Positivo

Tabla 3. Interpretación de resultados de acuerdo con la relación óptica.

8.9.2 Identificación cualitativa de anticuerpos IgM contra en antígeno del dengue en suero.



Figura 12. Diagrama de flujo para la identificación de IgM para el DENV

8.9.4 Cálculo de la relación muestra para IgM, control de calidad e interpretación

1. Calcule la absorbancia promedio de los triplicados del calibrador y multiplique por el factor de calibración. Este es el valor del punto de corte.

2. El valor índice se puede calcular dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor del punto de corte.

De manera alternativa:

3. Las unidades Panbio se pueden calcular multiplicando el valor índice

$$\text{Valor índice} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{valor del punto de corte}}$$

Absorbancia media del calibrador = 0.802

Factor de calibración = 0.62

Valor del punto de corte = 0.802 x 0.62 = 0.497

CONTROL DE CALIDAD: Para validación de la manipulación se cumplieron con los siguientes criterios:

- Control positivo, Valor índice > 1.1
- Control negativo, Valor índice <0.9
- La absorbancia de calibradores > 0.200

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo con el valor índice calculado multiplicado por 10, para la obtención de unidades Panbio, se realiza la interpretación de los resultados especificado en la tabla 4.

ÍNDICE	UNIDADES PANBIO	RESULTADO
<0.9	<9	Negativo
0.9-1.1	9-11	Dudoso
>1.1	>11	Positivo

Tabla 4. Interpretación de resultados de acuerdo con unidades Panbio.

8.10 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA OBJETO DE ESTUDIO

Se realizó la caracterización de la muestra objeto de estudio, según el género, edad, desplazamiento en los últimos 30 días y sintomatología presentada ante la picadura de algún mosquito.

8.10.1 Género

Dicha variable se codificó en

1. Femenino
2. Masculino

8.10.2 Edad

Para fines de esta investigación dicha variable se codificará a partir de los 19 a 25 años

8.10.3 Desplazamiento en los últimos 30 días

Dicha variable va dirigida principalmente a entidades del sur del país (principalmente) como Guerrero, Michoacán y Veracruz que cuentan con las condiciones favorables para el desarrollo del vector transmisor del DENV como se observa en la figura 13, aunque debido a la variabilidad del mosquito para alcanzar nuevas altitudes, en base a los reportes de dengue y la participación de los estudiantes de la UAEMex, se consideraran algunos municipios del Estado de México, entre ellos, Acambay, Amatepec, Malinalco, Tecámac, Tejupilco, Valle de Bravo y Villa del Carbón.

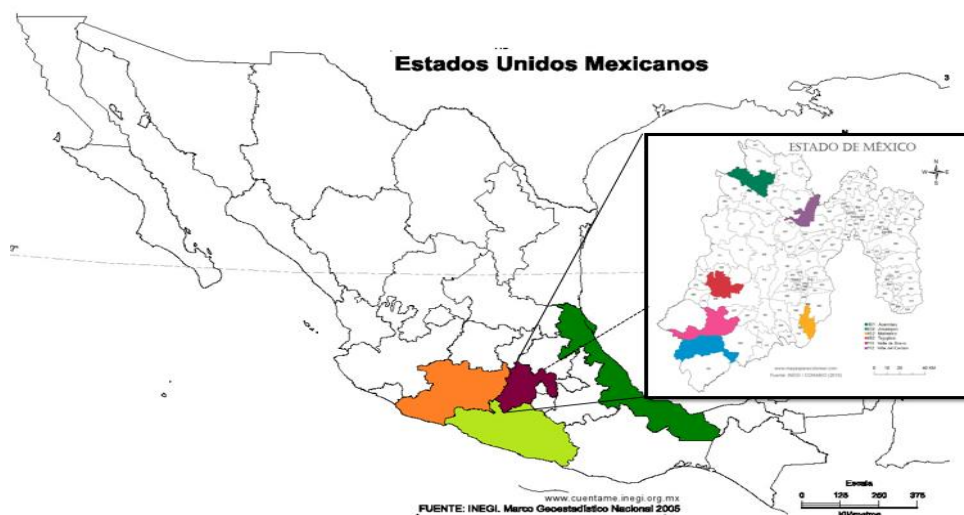


Figura 13. Estados y municipios a los que hubo desplazamiento en los últimos 30 días.

8.10.4 Sintomatología posterior a la picadura de un mosquito

Entre las que se encuentran principalmente:

1. Rash/ Erupción
2. Fiebre
3. Cefalea
4. Dolor de cabeza
5. Petequias
6. Dolor abdominal
7. Vomito
8. Dolor retrorticular

8.11 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA Ag NS1 Y DE LA IgM

Una vez evaluados los resultados, se determinó la positividad para Ag Ns1 e IgM a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Positividad} = \frac{(\text{Numero de muestras positivas})(100)}{\text{Numero total muestras analizadas}}$$

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Atendiendo las características del estudio para la identificación de Ag NS1 e IgM, todos los datos obtenidos en el estudio fueron tratados respetando la integridad de los participantes, de acuerdo con el código Helsinki (2013) los alumnos participantes firman carta de consentimiento informado antes de la toma de muestra, dando cumplimiento a uno de los principios generales de la ética en los estudios clínicos.

Dicho protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del CICMED con el registro número 2017/05

10. RESULTADOS

10.1 CONTROL DE CALIDAD PARA LA DETECCIÓN DE Ag NS1 DEL DENV

Para validación de manipulación se cumplieron con los siguientes criterios

- Valor de la densidad óptica
CO>0.200
- Relaciones

Relación R3(Control Negativo) < 0.40

$$\text{Relación R3} = \frac{DO_{R3}}{CO}$$

Relación R5 (Control Positivo) > 1.50

$$\text{Relación R5} = \frac{DO_{R5}}{CO}$$

Calculo del valor umbral CO, corresponde al valor medio de las densidades ópticas de los duplicados del calibrador.

Se obtuvieron las siguientes densidades ópticas del calibrador. Tabla 5

CALIBRADOR	DENSIDAD ÓPTICA
R4	1,033
R4´	0.87
CO	0.952

Tabla 5. Absorbancias del duplicado del calibrador para Ag NS1

Para obtener la relación, se requirió del valor de las absorbancias de R3 Y R5 (control negativo y positivo respectivamente). Tabla 6.

CONTROL	ABSORBANCIA	RELACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
R3	0.379	$Relacion R3 = \frac{0.379}{0.952}$	0.398	SI CUMPLE
R5	2.354	$Relacion R5 = \frac{2.354}{0.952}$	2.472	SI CUMPLE

Tabla 6: Obtención de la relación de control negativo y control positivo

10.2 CONTROL DE CALIDAD PARA LA DETERMINACIÓN DE IgM PARA EL DENV

Para validación de la manipulación se cumplieron con los siguientes criterios:

- Control positivo, Valor índice > **1.1**
- Control negativo, Valor índice <**0.9**
- La absorbancia de calibradores > **0.200**

Cálculos

Para obtener el punto de corte se calculó el promedio de los triplicados del calibrador y posteriormente se multiplicó por el factor de calibración. Tabla 7.

CALIBRADOR	ABSORBANCIA
1	0.233
2	0.209
3	0.229
4	0.216
5	0.211
6	0.224
7	0.223
8	0.227
9	0.214
PROMEDIO	0.221
SD	0.008

Tabla 7. Absorbancia de los triplicados del calibrador

$$\text{Factor de calibración} = (0.221) * 0.62$$

$$= \mathbf{0.137}$$

El valor índice se obtiene de la división de la absorbancia del control entre el factor de calibración. En la tabla 8 se puede apreciar el cálculo de los triplicados del control positivo y negativo.

$$\text{Valor índice} = \frac{\text{absorbancia del control}}{\text{factor de calibración}}$$

CONTROL	ABSORBANCIA	CÁLCULO DE VALOR INDICE	RESULTADO	CUMPLE
Positivo	0.685	$= \frac{0.685}{0.137}$	5.006	SI
Positivo	0.655	$= \frac{0.655}{0.137}$	4.787	SI
Positivo	0.678	$= \frac{0.678}{0.137}$	4.955	SI
Negativo	0.091	$= \frac{0.091}{0.137}$	0.665	SI
Negativo	0.063	$= \frac{0.685}{0.137}$	0.460	SI
Negativo	0.074	$= \frac{0.685}{0.137}$	0.540	SI

Tabla 8. Obtención del valor índice del triplicado de los controles positivo y negativo.

10.3 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA PARA IDENTIFICACIÓN DE Ag NS1

10.3.1 Caracterización de la muestra según Género

La muestra en estudio para la identificación de Ag NS1 estuvo constituida por 60 participantes, de las cuales el género predominante fue el femenino con un 58.3% (n=35), mientras que el masculino alcanzó un 41.7% (n=25) como se observa en la figura 14.

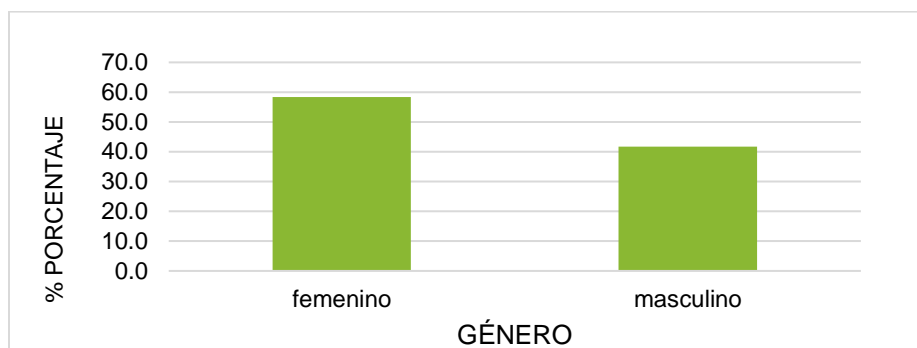


Figura 14. Caracterización de la muestra según Género

10.3.2 Caracterización de la muestra según edad

En la figura 15 se observa el porcentaje de participación por grupo de edad a partir de los 19 años hasta los 25 años, quedando de la siguiente manera; el grupo de edad con mayor porcentaje de participación es de 22 años con 28.3%(n=17), en segundo lugar es el de 21 años con 26.7% (n=16) y en tercer lugar el de 20 años con un 23.3% (n=14), se tuvo menor participación de los grupos de edad de 23 años con un porcentaje del 8.3% (n=5), 24 y 25 años con un 5% (n=3) cada uno y finalmente el de 19 años con un 3.3% (n=2). Figura15.

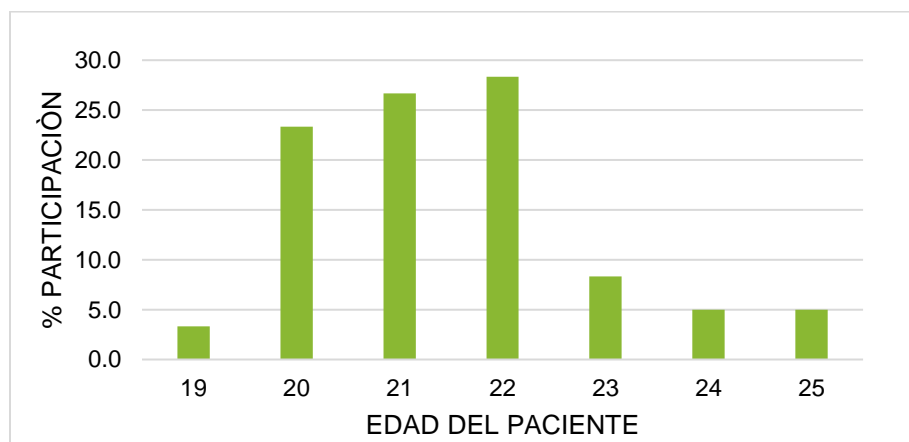


Figura 15. Caracterización de la muestra según edad

10.3.3 Caracterización de la muestra según desplazamiento en los últimos 30 días antes de la toma de muestra de sangre periférica.

De un total de 60 pacientes, 65% (n=39) tuvieron viajes recurrentes a zonas endémicas del vector y a algunas regiones del Estado de México y 35% (n=21) no se desplazaron como lo muestra la figura 16. Del 65% de las personas que se desplazaron en la figura 17 se muestra que al estado al que han tenido mayor desplazamiento ha sido Michoacán con un 25.6% (n=10), siguiéndole el Estado de Guerrero con un 15.4% (n=6), Valle de Bravo con un 12.8% (n=5), Villa del Carbón y Querétaro con un 10.3% (n=4) cada uno, entre los lugares con menor porcentaje de desplazamiento son algunos municipios del Estado de México, como Acambay con un 7.7% (n=3), Malinalco 5.1% (n=2), Tejupilco, Tecamac, Amatepec con un 2.6% (n=1) y finalmente los estados de Puebla y Veracruz con un 2.6% (n=1) cada uno.

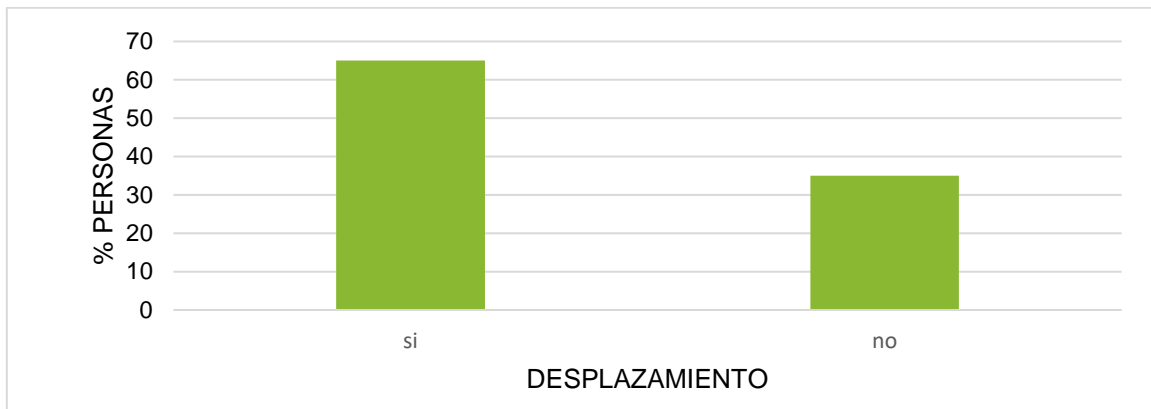


Figura 16. Caracterización de la muestra según desplazamiento

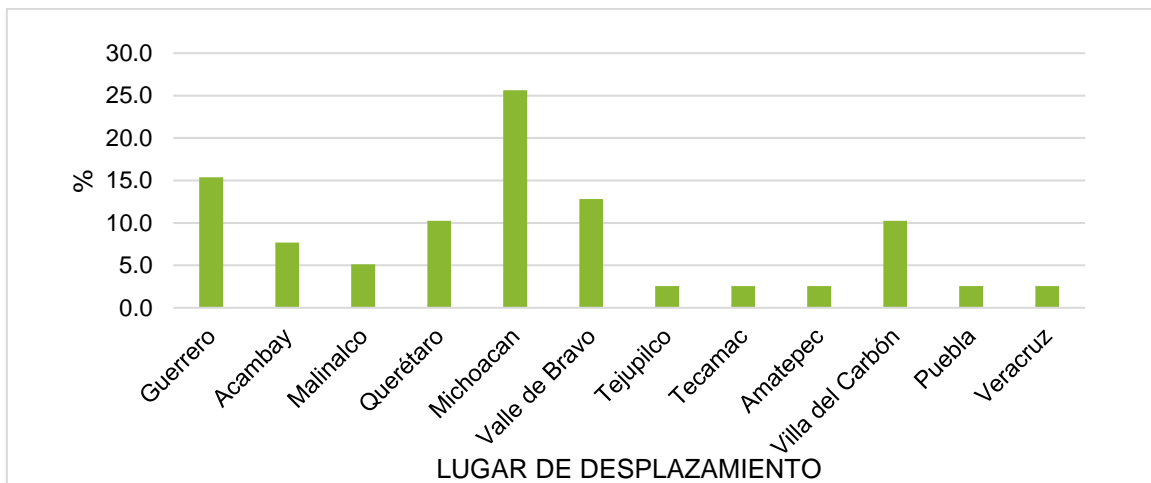


Figura 17. Caracterización de muestra según el lugar de desplazamiento

10.3.4 Caracterización de la muestra según sintomatología presentada después de la picadura de un mosquito

De un total de 60 personas estudiadas, en la figura 18 se observa que únicamente el 45% (n=27) presento sintomatología, el 55% (n=33) no presenta algún síntoma al recibir la picadura de algún tipo de mosquito.

Del 45% con sintomatología tenemos que el 88.9% (n=24) presenta rash/erupción, el 7.4% (2) además de sentir rash/erupción también presenta petequias y el 3.7% (n=1) presenta cefalea, fiebre y rash/erupción como se observa en la figura 19.

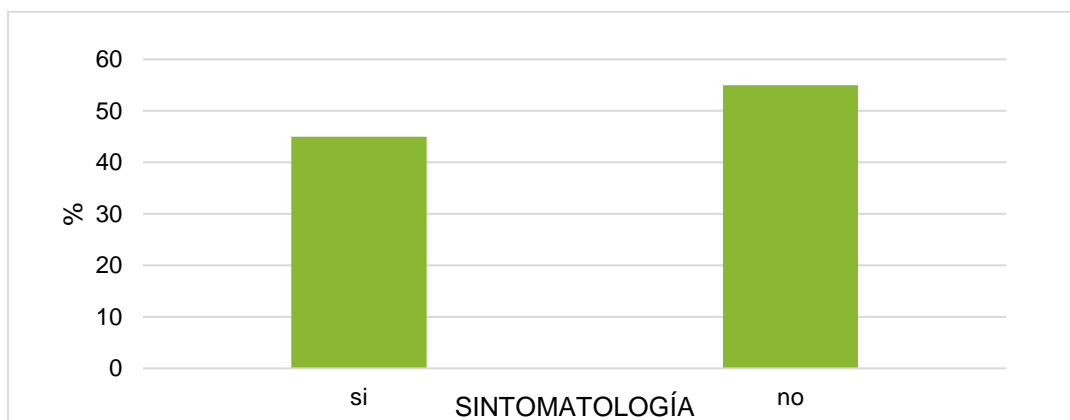


Figura 18. Caracterización de la muestra según sintomatología

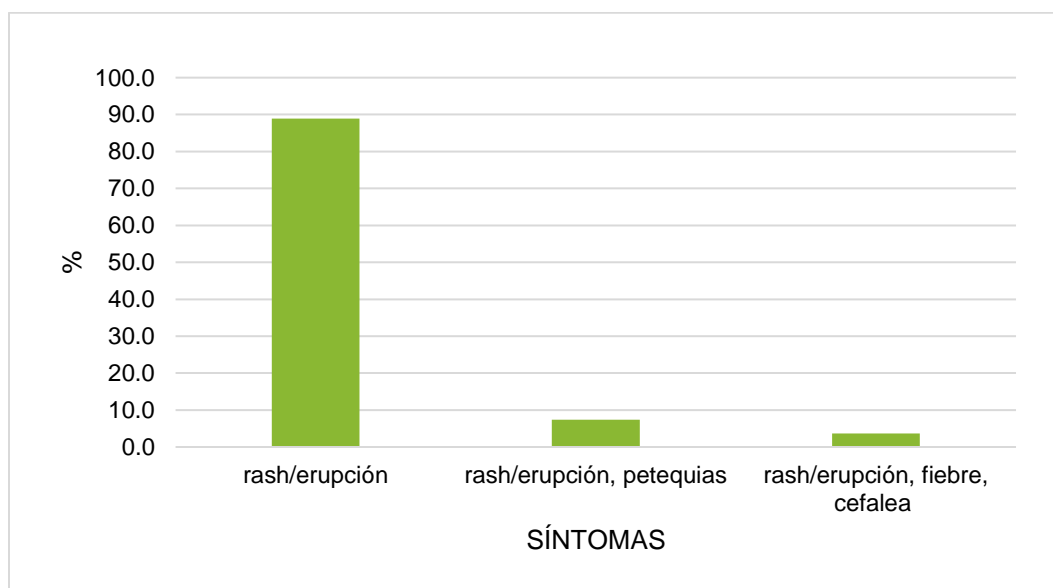


Figura 19. Caracterización de la muestra según tipo de sintomatología

10.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA PARA DETERMINACIÓN DE IgM

10.4.1 Caracterización de la muestra según Género

En la figura 20 se muestra que para la identificación de Ag NS1 se contó con 68 participantes, de los cuales el género predominante fue el femenino con un 58.8% (n=40), mientras que el masculino alcanzó un 41.2% (n=28).

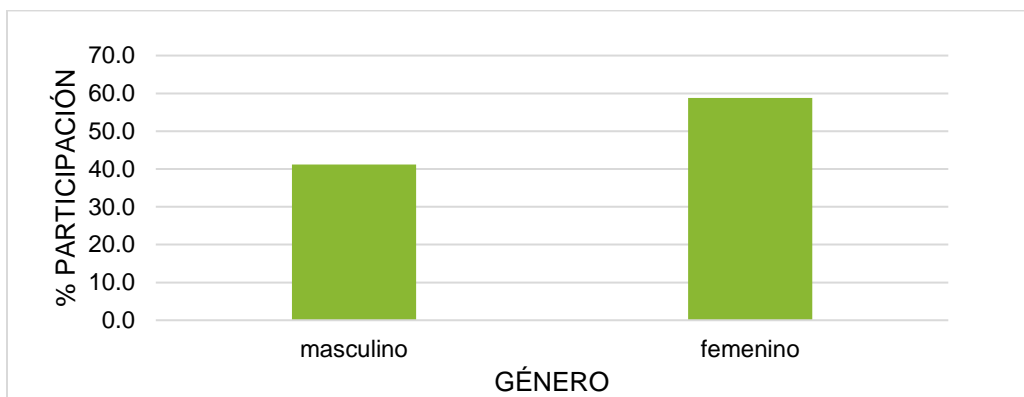


Figura 20. Caracterización de la muestra según género

10.4.2 Caracterización de la muestra según edad

Los participantes se agruparon por año a partir de los 19 años hasta los 25 años, quedando el porcentaje de participación de la siguiente manera como se aprecia en la figura 21; el grupo de edad con mayor porcentaje de participación es de 21 años con 27.9%,(n=19) en segundo lugar, es el de 22 años con 26.5% (n=18) y en tercer lugar el de 20 años con un 22.1% (n=15), se tuvo menor participación de los grupos de edad de 23 y 24 años con un 8.8% (n=6) y 5.9% (n=4) correspondientemente, finalmente los grupos de edad de 19 y 25 años tuvieron un 4.4% (n=3) cada uno.

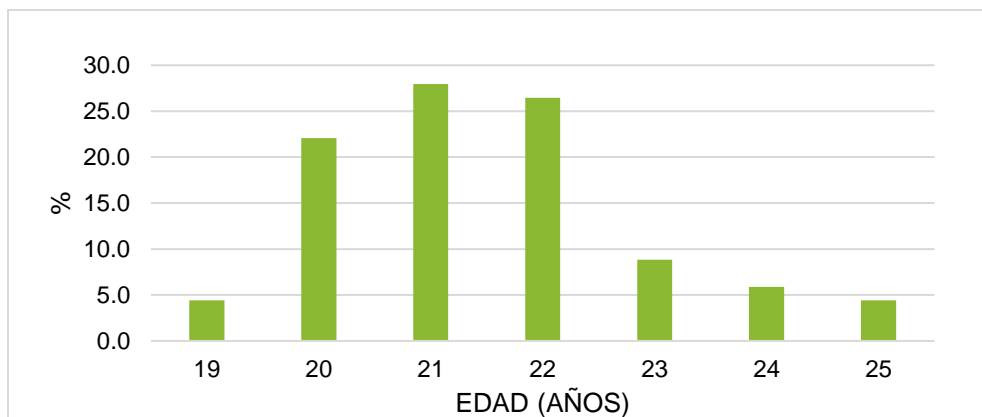


Figura 21. Caracterización de la muestra según edad.

10.4.3 Caracterización de la muestra según desplazamiento en los últimos 30 días antes de la toma de muestra de sangre periférica.

En la figura 22 se muestra el porcentaje de desplazamiento al que tuvieron los 24 pacientes positivos a IgM (100%) en diversas regiones de la República Mexicana (principalmente el sur). Se observa que al Estado al que han tenido mayor desplazamiento ha sido Guerrero con un 29.2% (n=7), siguiéndole el Estado de Michoacán con un 25% (n=6); y algunos municipios del Estado de México como Valle de Bravo con un 16.7% (n=4), Acambay 8.3% (n=2), Malinalco, Amatepec, Tejupilco y Villa del Carbón con un 4.2% (n=1) cada uno, finalmente el Estado de Veracruz con un 4.2% (n=1) Figura 22.

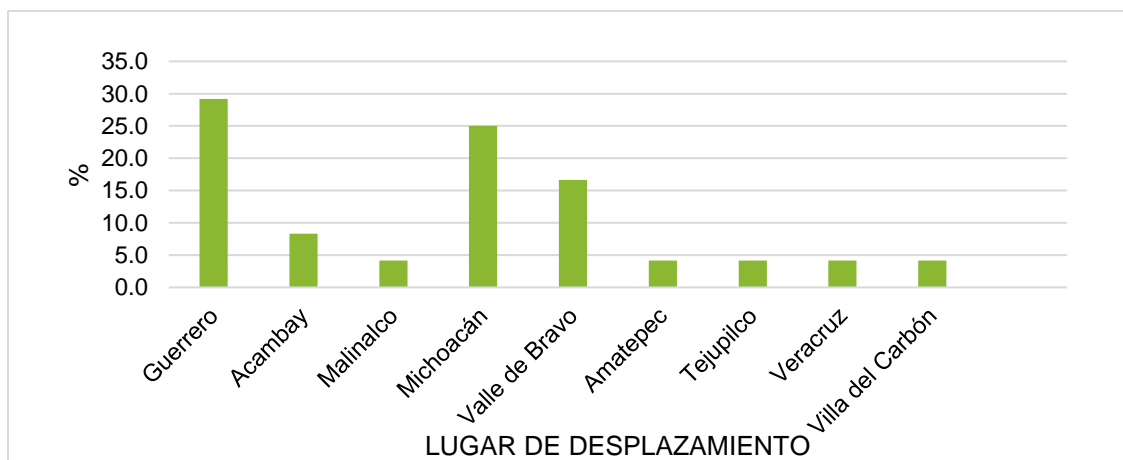


Figura 22. Caracterización de muestra según el lugar de desplazamiento

10.4.4 Caracterización de la muestra según sintomatología presentada después de la picadura de un mosquito

De un total de 24 personas con IgM positiva, el 50% presentaron sintomatología, mismo porcentaje que tuvieron los pacientes sin síntomas presentados el cual se muestra en la figura 23. En la figura 24, de la mitad de pacientes con sintomatología el 83.3% (n=10) presenta rash/erupción, el 8.3% (n=1) además de sentir rash/erupción también presenta petequias y finalmente el 8.4% (n=1) restante presenta cefalea, fiebre y rash/erupción.

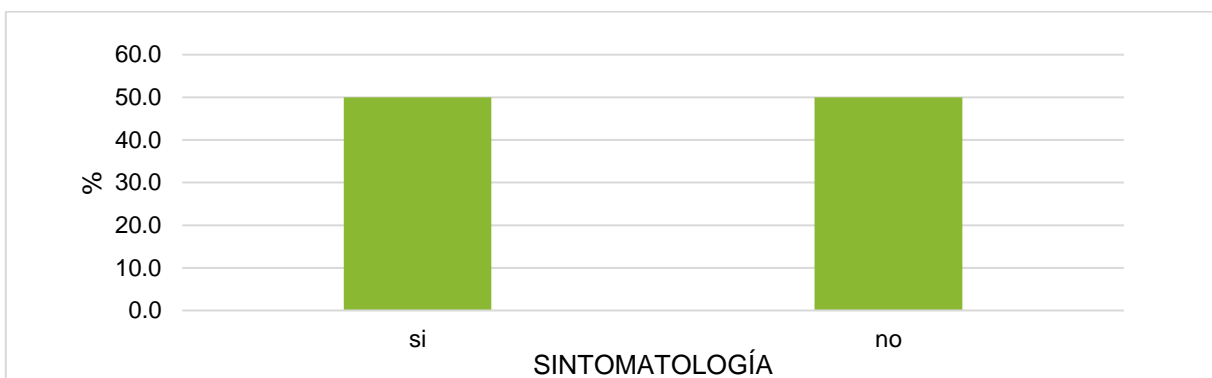


Figura 23. Caracterización de la muestra según sintomatología

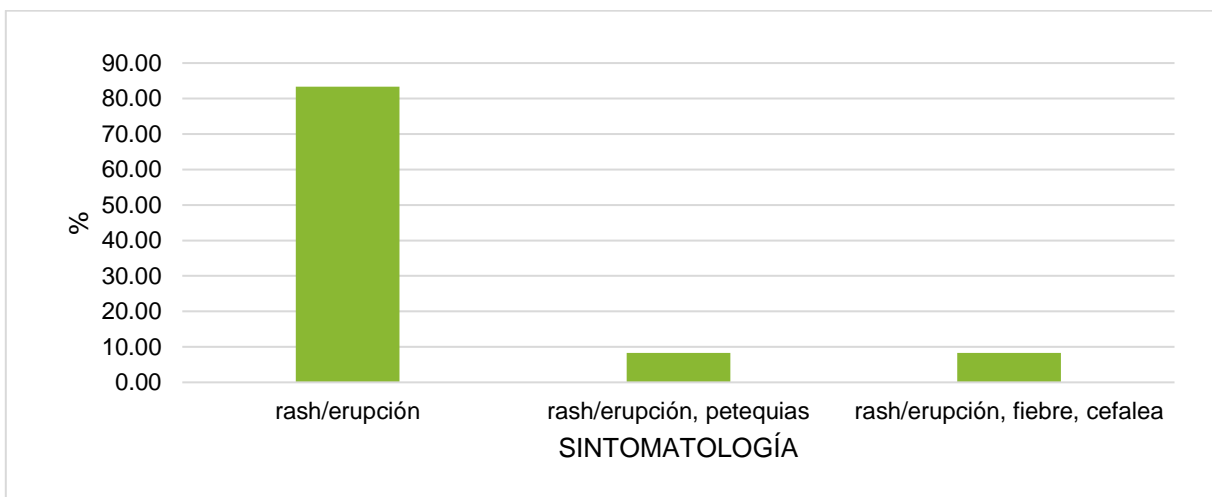


Figura 24. Caracterización de la muestra según tipo de sintomatología

10.4.5 Caracterización de la muestra según antecedentes de dengue.

De los 24 pacientes que resultaron positivos para IgM, el 83.3% (n=20) refiere no tener antecedentes de DENV, 12.5% (n=3) de la población desconoce si ha tenido la enfermedad y una persona (4.2%) refirió haber tenido antecedentes de DENV, se muestra en la figura 25.

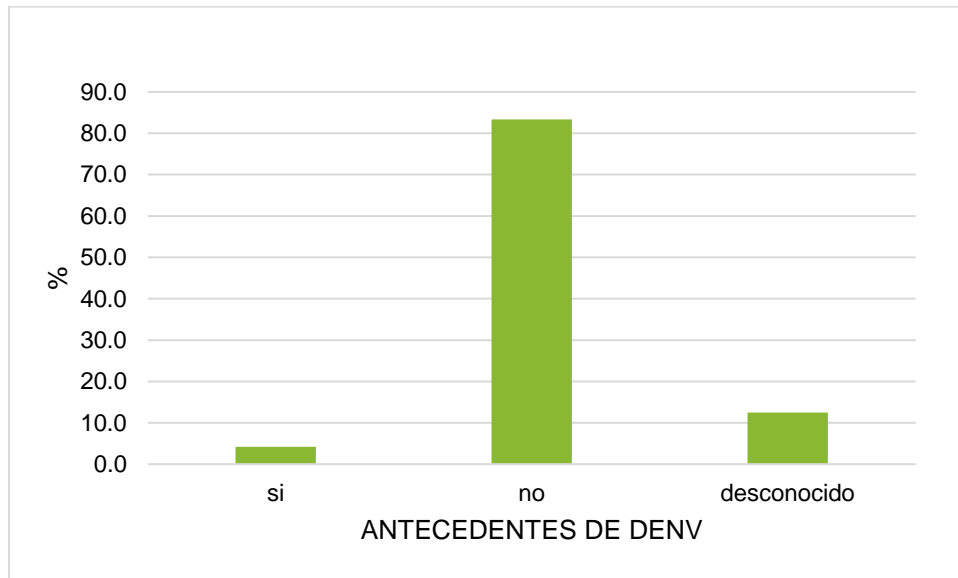


Figura 25. Caracterización de la muestra según antecedentes de DENV.

10.5 TABLA DE DATOS Y RESULTADOS

FOLIO	GÉNERO	EDAD (AÑOS)	DOMICILIO	DESPLAZAMIENTO ÚLTIMOS 30 DÍAS	ANTECEDENTES DE DENV	SÍNTOMAS A LA PICADURA	RESULTADOS IgM	RESULTADOS AgNS1	
1	F	25	Toluca	si	Morelos	no	No	negativo	negativo
2	F	23	Ixtlahuaca	si	Malinalco	no	rash erupción	positivo	negativo
3	F	19	Metepec	si	Querétaro	no	rash erupción	negativo	negativo
4	F	21	Michoacán	si	Zitácuaro	no	rash erupción	negativo	negativo
5	M	21	Michoacán	si	Tuzantla	no	No	negativo	negativo
6	M	22	Toluca	si	Acapulco	no	No	positivo	negativo
7	M	20	Toluca	no	*****	no	rash erupción	negativo	negativo
8	F	22	Michoacán	si	Acambay	no	No	positivo	negativo
9	M	23	Acambay	si	Villa del Carbón	no	rash erupción	negativo	negativo
10	F	25	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo

11	M	21	Toluca	si	Cuetzalán, Puebla	No	rash erupción	negativo	negativo
12	M	21	Toluca	no	*****	Desc.	No	negativo	negativo
13	F	25	Zinacantepec	no	*****	No	rash erupción	negativo	negativo
14	F	21	Guerrero	si	Taxco, Gro	no	No	negativo	negativo
15	M	20	Guerrero	si	*****	no	No	negativo	negativo
16	M	21	Metepc	no	*****	no	No	negativo	negativo
17	M	21	Toluca	si	Michoacán	no	No	positivo	negativo
18	M	19	Temascalcingo	si	*****	no	No	negativo	negativo
19	M	22	Toluca	no	Michoacán	Desc.	rash erupción	positivo	negativo
20	F	22	Toluca	si	Acapulco Iguala	Desc.	rash erupción	negativo	negativo
21	F	23	Toluca	si	Coatepec, Veracruz	Desc.	No	positivo	negativo
22	F	21	Zinacantepec	no	*****	no	No	negativo	negativo
23	M	21	Toluca	no	*****	no	rash erupción	negativo	negativo
24	M	21	Toluca	no	Taxco, Gro	no	rash erupción	positivo	negativo
25	M	21	Valle de Bravo	si	*****	no	No	negativo	negativo

26	F	22	Zinacantepec	no	Guerrero	no	No	positivo	negativo
27	F	22	Metepec	si	Valle de Bravo	no	rash erupción	positivo	negativo
28	M	22	Tejupilco	si	Valle de Bravo	Desc.	rash erupción	negativo	negativo
29	F	21	Toluca	si	Villa del Carbón	no	No	negativo	negativo
30	F	20	Santiago Tlacotepec	si	El Oro	no	rash erupción	negativo	negativo
31	F	21	Tenango del Valle	si	Malinalco	no	rash erupción	negativo	negativo
32	F	20	Jocotitlán	no	*****	no	rash erupción	negativo	negativo
33	M	21	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo
34	M	21	Toluca	si	Villa del Carbón	no	rash erupción	positivo	negativo
35	F	23	Toluca	si	Querétaro	no	No	negativo	negativo
36	F	22	Ixtlahuaca	si	Valle de Bravo	no	No	positivo	negativo
37	F	22	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo
38	M	22	Morelos	no	*****	no	No	negativo	negativo
39	M	22	Toluca	si	Tejupilco	no	No	positivo	negativo

40	F	22	Atlacomulco	no	*****	no	rash erupción petequias	negativo	negativo
41	F	24	Toluca	si	Querétaro	no	No	negativo	negativo
42	F	20	Toluca	si	Tecámac	no	No	negativo	negativo
43	F	20	Toluca	si	Chilpancingo Acapulco	no	rash erupción	positivo	negativo
44	F	21	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo
45	F	20	Toluca	si	Taxco, Gro	no	rash erupción	positivo	negativo
46	F	20	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo
47	M	20	Toluca	no	*****	no	No	negativo	negativo
48	F	22	Toluca	si	Zitácuaro, Michoacán	no	No	positivo	negativo
49	M	20	Toluca	si	Zitácuaro, Michoacán	Desc.	No	positivo	negativo
50	M	23	Michoacán	si	Parácuaro, Michoacán	No	rash erupción petequias	positivo	negativo
51	F	22	Almoloya de Juárez	no	*****	no	rash erupción	negativo	negativo

52	F	24	Toluca	si	Palmar, Amatepec	si	rash erupción	positivo	negativo
53	M	20	Toluca	si	Valle de Bravo	no	No	positivo	negativo
54	F	20	Toluca	si	Tlalpujahuá, Michoacán	no	No	positivo	negativo
55	F	22	Toluca	si	Chilpancingo, Gro.	no	rash erupción fiebre cefalea	positivo	negativo
56	F	22	Coatepec Harinas	no	*****	no	rash erupción	negativo	negativo
57	F	22	Santiago Tenango	no	*****	no	No	negativo	negativo
58	M	20	Valle de Bravo	si	Acapulco, Gro.	no	No	positivo	negativo
59	M	20	Jilotepec	si	Acambay	no	rash erupción	positivo	negativo
60	F	24	Malinalco	si	Valle de Bravo	no	rash erupción	positivo	negativo
61	F	20	Tenango del Valle	si	Guerrero	no	No	negativo	sin dato

62	M	23	Atacomulco	no	*****	no	No	negativo	sin dato
63	F	21	Toluca	no	*****	no	No	negativo	sin dato
64	F	21	Toluca	no	*****	no	No	negativo	sin dato
65	F	19	Jiquipilco	no	*****	no	No	negativo	sin dato
66	M	21	Metepec	no	*****	si	rash erupción	negativo	sin dato
67	F	22	Jocotitlán	no	*****	si	rash erupción	negativo	sin dato
68	M	24	Ixtlahuaca	no	*****	si	rash erupción	negativo	sin dato

Tabla 9. Caracterización de la muestra para Ag NS1 e IgM del DENV

10.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA Ag NS1

Una vez evaluados los resultados de 60 muestras analizadas, se determinó el porcentaje de positividad para Ag NS1 a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Positividad} = \frac{(0 \text{ muestras positivas})(100)}{60 \text{ muestras analizadas}}$$

EL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA EL Ag NS1 DEL DENV ES 0%

10.7 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LA IgM PARA EL DENV

De un total de 68 muestras analizadas para la identificación de IgM se determinó el porcentaje de positividad de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Positividad} = \frac{(24 \text{ muestras positivas})(100)}{68 \text{ muestras analizadas}} = 35,3\%$$

RESULTADO	No. MUESTRAS	%
NEGATIVO	36	53.0
DUDOSO	8	11.7
POSITIVO	24	35.3

EL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA IgM PARA EL DENV ES DE 35.3%

11. DISCUSIÓN

En este estudio se planteó como objetivo principal, identificar el Antígeno NS1 del virus del Dengue y el anticuerpo IgM para el DENV mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en suero de estudiantes de nivel superior de la UAEMex, con la finalidad de determinar la presencia de Ag NS1 e IgM en al menos el 5% de la población estudiada que se exponen al virus del Dengue mediante la picadura del mosquito del género *Aedes*.

Algunos métodos de diagnóstico utilizados en la actualidad reducen significativamente los tiempos de procesamiento y aportan información detallada sobre el agente etiológico de la enfermedad, pero lamentablemente resultan ser muy costosos como lo es el aislamiento del virus o el desarrollo de la RT-PCR que se realiza a partir de muestras agudas de menos de cuatro días del inicio de los síntomas, y que además requiere personal capacitado en biología molecular y un laboratorio con infraestructura de Nivel de Bioseguridad 2.^{47,48}

Por lo que regularmente se sigue recurriendo a métodos menos costosos pero que brindan la confiabilidad necesaria en los resultados emitidos como es el caso de la detección de Ag NS1 del virus del dengue y detección de IgM, mediante ELISA, para el virus del dengue.

Para la detección del Ag NS1 del DENV se trabajó con una población de 60 estudiantes de nivel superior de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de México, principalmente el estudio fue dirigido a aquellas personas que viven o viajaron a zonas donde se han reportado casos de dengue.

De las 60 muestras analizadas el género predominante de participación fue el femenino con un 58.3%, mientras que el masculino alcanzó un 41.7%, de acuerdo al cuestionario realizado, 65% de la población en estudio tuvieron desplazamiento y 35% no se desplazaron, de este 65% de las personas que se desplazaron encontramos que al estado al que han tenido mayor desplazamiento ha sido Michoacán con un 25.6%, siguiéndole el Estado de Guerrero con un 15.4%, Valle de Bravo con un 12.8%, Villa del Carbón y Querétaro con un 10.3%, entre los lugares con menor porcentaje de desplazamiento son algunos municipios del Estado de México, como Acambay con un 7.7%, Malinalco 5.1%, Tejupilco, Tecámac, Amatepec con un 2.6% y finalmente los estado de Puebla y Veracruz con un 2.6%.

En relación con la sintomatología presentada al momento de recibir la picadura de algún mosquito se encontró que el 55% de la población no presenta algún síntoma y 45% presenta sintomatología, de este porcentaje, el 88.9% presenta rash/erupción, el 7.4% además de sentir rash/erupción también presenta petequias y el 3.7% presenta cefalea, fiebre y rash/erupción.

La positividad de la serología para el antígeno NS1 del DENV fue 0%, al momento de la toma de muestra no se observó que algún paciente cursara por fiebre, presencia de petequias o algún otro síntoma característico de la enfermedad, cabe destacar que esta proteína no estructural ampliamente utilizada para el diagnóstico de dengue es detectable desde el primer día de fiebre hasta los nueve días de enfermedad en suero ⁴⁹, lo cual indica que ningún paciente estaba cursando por la enfermedad.

Sin embargo, existen otro tipo de determinaciones como lo es la identificación de IgM contra el DENV, la cual fue identificada mediante ELISA, en 68 pacientes, cuyo porcentaje de participación de hombres y mujeres fue de 41.2% y 58.8% respectivamente.

De acuerdo al cuestionario realizado, el 100% de la población que resultó positiva para IgM tuvieron desplazamiento, 29.2% fueron a Guerrero, Estado al que han tenido mayor desplazamiento; en segundo lugar se encuentra el Estado de Michoacán con un 25%, siguiéndole algunos municipios del Estado de México entre los que están Valle de Bravo con 16.7%, Acambay con 8.3%, Malinalco, Amatepec, Tejupilco y Villa del Carbón con un 4.2% y finalmente el Estado de Veracruz con un 4.2%.

En relación con la sintomatología presentada al momento de recibir la picadura de algún mosquito se encontró que el 50% de la población no presenta algún síntoma y el otro 50% presenta síntomas. La mitad de la población positiva para IgM que presentó algún síntoma posterior a la picadura de un mosquito el 83.4% presenta rash/erupción, el 8.3% además de sentir rash/erupción también presenta petequias y el 8.3% presenta cefalea, fiebre y rash/erupción.

En el estado de México hace 6 años no se observaban reportes de casos de dengue tan considerables como en la actualidad, estos resultados muestran que el vector se ha expandido, principalmente por la información insuficiente en torno a los síntomas, el mecanismo de transmisión y los reservorios del vector, o algunas dimensiones culturales que obstaculizan la prevención del dengue: información confusa e insuficiente, la atribución

de la responsabilidad de prevenir a otras personas u organismos públicos y la excesiva confianza en la fumigación como medida preventiva.⁵⁰

De los 24 pacientes que resultaron IgM positivos solamente una paciente tuvo antecedente de la enfermedad en cuestión, tuvo hospitalización 6 meses antes de la toma de muestra, lo que indica que los anticuerpos IgM séricos además de detectarse en pacientes infectados por el dengue entre los primeros tres y cinco días posteriores el comienzo de la fiebre, y que generalmente persisten durante 30 a 90 días, también existen niveles detectables a los ocho meses de la infección.⁴⁶

El porcentaje de positividad para IgM contra el DENV fue de 35.3%, una negatividad de 74.7% y un pequeño porcentaje dudoso de 9.9% el cual se considera como negativo debido al contraste que se realizó con el cuestionario aplicado ya que los ocho pacientes que estuvieron en este porcentaje negaron haber viajado y/o vivir en zonas endémicas y presentar síntomas como fiebre, erupción cutánea, petequias o algún otro síntoma al recibir la picadura de algún mosquito, además de que las densidades ópticas de estas muestras se encuentran muy cerca al punto de corte cuyo valor es de 0.137.

En relación con el porcentaje de positividad, 25 pacientes negaron haber tenido hospitalización por DENV en los últimos seis meses antes de la toma de muestra, lo que indica que recibieron la picadura del mosquito, pero cursaron de forma asintomática, se estima que esto ocurre en cuatro de cada diez casos. Además, la IgM contra el dengue puede ser detectada en el 99% de los pacientes hasta dos o tres meses después de la infección.^{29,49}

El Dengue Asintomático es la infección por el virus del dengue que no presenta manifestación clínica, pero deja memoria inmunológica que puede ser detectada desde el sexto día de contacto con el virus; se describe como la forma de infección del Dengue más frecuente según algunos autores.⁴⁹

Cabe destacar que la gravedad de la enfermedad depende de la carga de la viremia, de la respuesta del sistema inmune y de la magnitud de las sustancias reactivas de la fase aguda, dando una gama de cuadros clínicos que van desde infecciones inaparentes, cuadro febril inespecífico, Fiebre por Dengue ó Dengue Clásico, Dengue Hemorrágico (DH), hasta el más grave, el Síndrome de choque por Dengue (SSD).^{51,52}

La gravedad y el tipo de respuesta inmune pueden depender de los polimorfismos del gen DC-SIGN (CD209) que codifica para la lectina de tipo C, conocida por ser el principal

receptor de dengue en células dendríticas humanas, y un el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora de CD209 (2336 A/G; rs4804803) es susceptible a muchas enfermedades infecciosas. Razonamos que las variaciones en el gen DC-SIGN podrían tener una amplia influencia en la replicación viral y respuestas inmunitarias del huésped.⁵³

Aunque también las características clínicas dependen a menudo de la edad del paciente, los niños mayores y los adultos pueden tener una enfermedad febril leve o la clásica enfermedad incapacitante de inicio abrupto, fiebre alta, cefalea intensa, dolor retroorbital, dolores musculares y articulares y erupción cutánea. Los lactantes y preescolares pueden sufrir desde una enfermedad febril indiferenciada con erupción maculopapular hasta complicaciones mayores.⁵⁴

De acuerdo con las guías de diagnóstico clínico de DENV en México, entre las pruebas confirmatorias para ello se encuentran IgG positiva, IgM positiva y Antígeno NS1 positivo desde el día de inicio de fiebre hasta os 5 días posteriores en ELISA, la aparición de síntomas del dengue se caracteriza por la presencia del antígeno NS1 (dengue) en el suero del paciente. NS1 es una glicoproteína común a todos los serotipos del dengue y se la puede utilizar para detectar infecciones primarias o secundarias en las primeras etapas de la enfermedad.⁵⁵

El InDRE menciona que las pruebas serológicas para los anticuerpos específicos al dengue, tipos IgG e IgM, pueden ser útiles para confirmar el diagnóstico primario o secundario. En las infecciones primarias y secundarias, IgM se presenta después de aproximadamente 5 días; mientras que IgG se produce entre 2 y 4 semanas después de la aparición de la infección primaria y casi inmediatamente después de la aparición de una infección secundaria.⁵⁵

Las causas de la positividad de IgM en muestras de paciente que viajaron a municipios donde el reporte de casos de dengue ha sido muy bajo, conviene principalmente a que el mosquito transmisor del virus se está adaptando a nuevas alturas debido al cambio climático y evolución del mismo principalmente, y a condiciones que favorecen su transmisión como dejar agua estancada por mucho tiempo, y aunque el estado de México se encuentre dentro de una incidencia baja de dengue hay riesgo de contagio en municipios como Amatepec, Acambay, Malinalco, Valle de Bravo, Tejuzilco y Tecámac.

De acuerdo con el seguimiento del dengue en Estado de México se observa una mayor incidencia a partir del año 2012, con un incremento muy notorio del 2013 hasta la fecha principalmente en las Jurisdicciones Sanitarias de Tejupilco, Tenancingo, Amecameca, Ecatepec y Nezahualcóyotl, y aunque se observe un menor número de casos reportados en las Jurisdicciones Sanitarias como Atlacomulco, Ixtlahuaca y Jilotepec, es imprescindible prestar mucha atención a estas zonas,³⁴ debido a que la incidencia del dengue ha aumentado de manera constante en México, de 1.7 casos por 100 000 habitantes en el año 2000 a 43.03 casos por 100 000 habitantes en el 2012, debido a la urbanización creciente, sin controles adecuados, a la migración humana, a factores asociados al cambio climático con modificaciones en el ámbito ecológico, que han redundado en una expansión de los vectores, *Aedes aegypti* y *A. albopictus*.

Cabe destacar que en México ya se cuenta con la vacuna contra el dengue; vacuna quimérica tetravalente (para serotipos I, II, III y IV), elaborada a partir de virus vivos atenuados contra dengue (CYD-TDV), la cual se dio a conocer en un comunicado de prensa por la COFEPRIS, el 9 de Diciembre de 2015, en el cual hace mención que la autorización está indicada para poblaciones en las que el dengue es endémico, su seroprevalencia sea mayor al 60% y para personas entre 9 y 45 años de edad, rango en el que la eficacia de la vacuna llega a un punto máximo de conformidad a las recomendaciones emitidas por el Instituto Nacional de Salud Pública.⁵⁶

Es importante mencionar que la vacuna tiene mayor eficacia contra el serotipo Denv-4 y Denv-1, es decir, que si alguna persona se enferma de dengue con el serotipo Denv-3 Y especialmente Denv-4⁵⁷ es muy probable que no haya desarrollado inmunogenicidad y por tanto contraiga la enfermedad y aunque ya se aprobó en diversos países, otra interrogante es ¿responderán de la misma manera todos? es muy probable que no, debido a la diversidad de polimorfismos que tenemos en México y el Mundo.

Aunque una de las ventajas que se tienen con la introducción de la vacuna DENVVAXIA, registrada por Sanofi Pasteur es que, el control del mosquito vector y la administración de la vacuna en sus tres dosis que debe realizarse antes de cada segundo semestre en México reducirá principalmente el índice de casos reportados.

12. CONCLUSIONES

En las dos últimas décadas, en México se ha considerado una enfermedad de importancia para la salud pública por su magnitud y trascendencia, dado que en el territorio nacional existen áreas que reúnen condiciones que favorecen su transmisión. El dengue es una infección que ataca principalmente a los niños y a los individuos en edad productiva, lo que ocasiona pérdidas económicas y sociales.

La determinación de Ag NS1 del DENV fue negativa para una población de 60 estudiantes, sin embargo la identificación de IgM antidengue mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en suero de estudiantes de nivel superior de la UAEMex, fue positiva en un 35.3% de una población total de 68 muestras, demostrando la infección reciente por cualquiera de los serotipos y además, en ausencia de más de dos síntomas nos dice que se trata de Dengue Asintomático, este porcentaje de positividad se debe principalmente a factores de exposición como el desplazamiento que existe a zonas endémicas del país como son Guerrero, Michoacán y Veracruz, pero también al desplazamiento que hay a algunas zonas del estado de México como Amatepec, Acambay, Malinalco, Valle de Bravo y Tejupilco. Por lo que no se cumplió con la hipótesis.

Se realizó la caracterización de muestra en función al género para la identificación de Ag NS1 e IgM donde el género predominante fue el femenino con un 58.3% y 65.4% respectivamente

Se caracterizó la muestra, objeto de estudio en función al desplazamiento que tuvo a zonas como Michoacán, Guerrero, Veracruz y municipios del Estado de México como Amatepec, Malinalco, Acambay, Valle de Bravo y Villa del Carbón

Las causas de la positividad de IgM en muestras de paciente que viajaron a municipios donde el reporte de casos de dengue ha sido muy bajo, conviene principalmente a que el mosquito transmisor del virus se está adaptando a nuevas alturas debido al cambio climático, evolución del mismo y a los medios favorables que existen en zonas rurales como encharcamiento de agua principalmente

Otros de los factores que favorece la IgM positiva son haber viajado a zonas endémicas del DENV como Guerrero, Michoacán y Veracruz

Se determinó mediante un método inmunoenzimático tipo sándwich, de manera cualitativa o semicuantitativa el antígeno NS1 del virus del Dengue en suero el cual fue del 0%

Se superó la expectativa de un 5% de positividad esperada como mínimo resultado ya que en la determinación de IgM mediante prueba de ELISA de captura para el virus del dengue en suero, resultó positiva en un 35.3% de 68 muestras analizadas.

El uso de la vacuna contra el dengue debe seguir un enfoque integrado, es necesario evaluar la coadministración de CYD-TDV en el grupo de edades entre 9 y 16 años. Si México desea maximizar el impacto de la vacunación a corto plazo debe considerar campañas de recuperación y debe garantizar que cuentan con una capacidad de cadena de suministro adecuada a nivel nacional y en las zonas endémicas de dengue determinadas.

13. PERSPECTIVAS

A través de este estudio se pueden establecer nuevas investigaciones en los diferentes departamentos de salud que existen en cada municipio del Estado México sobre la serología presente al detectar que existe un caso de dengue, pues es muy importante y necesario contar con estudios de este tipo ya que es muy escasa.

Que este estudio permita la prevención adecuada del dengue, a nivel nacional, sobretodo prestar mucha más atención a las medidas necesarias para evitar tener las condiciones óptimas para el crecimiento y la propagación del vector, así mismo el cuidado personal como uso de repelentes, mosquiteros y ropa de manga larga.

Se espera que con este trabajo nuevas oportunidades de investigación se abran para los estudiantes en el área de diagnóstico oportuno del dengue y que el Químico Farmacéutico Biólogo sea visto como un elemento de colaboración imprescindible para la promoción de la salud.

14. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio aleatorio por municipios donde no se reportó dengue antes del 2010.

Realizar la determinación de cada serotipo circulante del DENV a nivel municipal en Estado de México debido al incremento considerable en los últimos 5 años.

Alertar e informar a la población de las medidas necesarias para evitar el contagio del dengue, sintomatología probable y a dónde acudir.

Que el personal de salud cuente con la habilidad de poder diagnosticar adecuadamente la enfermedad de acuerdo al cuadro clínico ya que podría confundirse, para evitar una evolución grave de la misma, y recurrir a pruebas de diagnóstico que nos permitan valorar mejor la enfermedad.

Tener mejor acceso a pruebas de diagnóstico como determinación de IgM e IgG para el dengue en zonas no endémicas de la República Mexicana, así como la facilidad de vacunar contra la enfermedad en cuestión.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Torres-Galicia Ivonne. Cortés-Poza David. Becker Ingeborg. (2014). Dengue en México: análisis de dos décadas. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.; Core de Bioestadística. Dirección de Investigación, Hospital General de México, México, D.F. Gaceta Médica de México. 2014; 150:122-7.
2. Cervantes Ocampo Arlette Areli. (2014). Epidemiología de la fiebre por dengue en Xalapa, Veracruz del año 2008 al 2011. Universidad Veracruzana. Instituto Mexicano del Seguro Social. Página 5
3. Thirión Icaza Jaime. (2003) El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. Bayer Environmental Science. Bayer de México, S.A. de C.V. Pág. 3
4. Owen Lloyd Bryan Marrugo. (2015). Evaluación in vitro del efecto de estatinas contra el virus del dengue (DENV). Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Medicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Página 12.
5. Enfermedades infecciosas Dengue. Diagnóstico de Dengue. Guía para el equipo de Salud. Ministerio de la Salud 3ª Edición. 2013. Página 5
6. Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (2016) Manuales Departamentales. Ciudad Universitaria, D.F., octubre de 2016.
7. Bacallao Martínez Gloria C. Dr. Quintana Morales Osbel. (2013) Dengue. Revisión bibliográfica. Hospital Provincial Universitario “Arnaldo Milián Castro”. Pág. 1-2
8. Valdez Tah Alba Rocío (2008). Influencia de la variabilidad del tiempo y del clima en la incidencia de dengue en la Península de Yucatán, México. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida. Pág. 8

9. Alarcón Hernández Gloria Paulina. (2016). Generalidades del dengue y situación epidemiológica en México. Dirección General de Epidemiología Secretaría de Salud. No. 14, Vol. 33 Semana 14. Pág. 4-5.
10. Hoja De datos sobre el dengue. (2015) Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) [Fecha de acceso febrero 2017] Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/hojados.htm>
11. Boletín Epidemiológico. FIDEC FUNCEI. No. 57. Enero de 2016. Pág. 2
12. Enfermedades transmitidas por vector. (2014) Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Última modificación: 12 de diciembre de 2014. [Fecha de acceso 15 agosto 2017]. En línea: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html>
13. Fajardo Dolci Germán. et al. (2012). El dengue en México. Conocer para mejorar la calidad de la atención. Revista Médica Institucional Mexicana del Seguro Social 2012; 50 (6): 631-639.
14. Detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno ns1 del virus del dengue en el suero o en el plasma humano mediante el método inmunoenzimático. Platelia™ dengue NS1 Ag 96 ensayos
15. Acosta Bas Carmen, Gómez Cordero Ivonne. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. Revisión. Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, Laboratorio Síntesis de Péptidos, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba. Revista Biomédica 2005; 16:113-137.
16. Fajardo Rossi Álvaro. (2011). Variabilidad genética del virus Dengue en la región sudamericana: Primeros abordajes epidemiológicos frente a una eventual reemergencia del virus Dengue en el Uruguay. Tesis de maestría en el Ciencias Biológicas Opción Biología Celular y Molecular, PEDECIBA. Laboratorio de Virología Molecular. Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica.
17. Guzmán, M. G. et al. (2010) Dengue: A continuing global threat. Nature Reviews Microbiology 8;7-16

18. Velandia Myriam L. Catellanos Jaime E. (2011) Dengue virus: structure and viral cycle. *Infectio*.2011; 15(1): 33-43
19. Chiou C, Andrew C, Chen P, Liao C, Lin Y, Wang J. (2003) Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J Gen Virol*. 84:2795-05
20. Zhili Zuo et al. (2009). Mechanism of NS2B-Mediated Activation of NS3pro in Dengue Virus: Molecular Dynamics Simulations and Bioassays. *Journal Virology*. 83:1060-70
21. Samsa Marcelo et al. (2009) Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathogens*. Vol. 5
22. Nature reviews (2011). *Inmunology*; Dengue respuesta inmune
23. Guía Práctica Clínica. Manejo del dengue grave y del dengue no grave, Guía de referencia rápida. Secretaria de Salud. Consejo de Salubridad. México.
24. Ríos Escalier César. Basagoitia Echalar Armado. (2014) dengue: Una Alarma Mundial. Artículo de revisión. *Ad Astra Volumen 5*. Número 1.
25. Urribarren Berrueta Teresa. Dengue, y otras infecciones no hemorrágicas: fiebre chikungunya, zika, fiebre del Nilo occidental y otros arbovirus. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
26. Organización Mundial de la Salud (OMS). Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Nueva edición 2009
27. Frassone Natalia E. Marianelli Leonardo G. (2014). Dengue: Revisión. *Sociedad de Infectología de Córdoba*. Pág. 1
28. Green Angela M. et al. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol*. 2014 March 20; 426(6): 1148–1160
29. Castro Mussot María Eugenia, et al. (2013). Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue, Artículo de revisión. *Gaceta Médica de México*. 2013; 149:531-4

30. Yauch Lauren E. et al. (2009). A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8+ T Cells. *J Immunol.* 2009 April 15; 182(8): 4865–4873
31. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de Salud. (2017). Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas:
32. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. (2017). Número de casos reportados de Dengue y Dengue grave en las Américas por país. *Semana Epidemiológica* 52.
33. Panorama Epidemiológico de Dengue 2016. Secretaria de Salud, Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud. Dirección General de Epidemiología. *Semana Epidemiológica* 52.
34. Manual de Organización, tipo de Jurisdicciones Sanitaria. (2010). *Gaceta de Gobierno del Estado de México*
35. *Semana Epidemiológica* No. 52 (2016). Boletín Epidemiológico del Estado de México. Año XIX. Vol. 992. Instituto de Salud del Estado de México. Gobierno del Estado de México.
36. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Ministerio de Salud Pública. Laboratorio de Arbovirus Departamento de Virología. Ciudad Habana, Cuba 2009. Pág. 8-9
37. Litman GW, Rast JP, Shamblott MJ, et al (1993). «Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire». *Mol. Biol. Evol.* 10 (1): Pág. 60–72.
38. Eleonora Market, F. Nina Papavasiliou (2003) Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. *PLoS Biology*1(1). [Fecha de acceso agosto 2017] Disponible en: <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=getdocument&doi=10.1371/journal.pbio.000016>
39. Janeway C.A, et al (2001). *Immunobiology*. 5ª edition. Garland Publishing. ISBN 0-8153-3642-X. [Fecha de acceso agosto 2017] Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View.ShowTOC&rid=imm.TOC&depth=10>

40. Calderón Pascasio Rocío Vanessa. (2007). Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca Morelos. Pág. 5,7,10.
41. Ochoa Azze Felipe Rolando. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Edit. Ediciones FINLAY. 1ª edición 2012. La Habana. Pag. 2,4,7.
42. González de Buitrago José M. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico 3ª Edición 2010. ELSEVIER MASSON. Pág. 413
43. Autor: Cultek, S.L.U. Fundamentos y tipos de ELISA. [Fecha de acceso agosto 2017] Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
44. Castañeda Nadia Y. et al. (2007). AEGY-28 Cell Line of *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) is Infection Refractory to Dengue 2 and Yellow Fever Virus. *Acta biol. Colomb.* 12(2):55-66
45. Aguilar Barroso Alicia. et al. (2005). Evaluación de la infectividad de cepas de dengue 1 en las líneas celulares HepG2 y Vero. *Revista Cubana Med. Trop.* 57(2):105-10
46. Panbio Dengue IgM Capture ELISA. Detección cualitativa de anticuerpos IgM contra el antígeno del dengue en suero.
47. Saavedra, G. and E. Quiroz, (2007). Diagnostico por laboratorio del dengue en Panamá. 1988-2004. *Rev. Hospital Niño Panamá.* 2007. 23: p. 24-30
48. Saxena, P., et al. (2008) Development and evaluation of one-step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virology*, Vol5:20
49. Moreno Brechla, et al. (2013). Evaluación de ELISA de captura para NS1 como nueva herramienta del diagnóstico temprano de la infección por Dengue en Panamá. *Revista Médica De Panamá.* RMDP - 2013; Volumen 34:8-13
50. Torres López Teresa M. et al. (2012). Dimensiones culturales del dengue que favorecen o dificultan su prevención en México. *Rev Panam Salud Publica* 31(3): 197-203
51. Gubler Duane J. and G. Clark Gary. (1995) Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 1, No. 2 April-June 1995.

52. Pizarro Daniel. (2009). Dengue, dengue haemorrhagic fever. Artículo de revisión. Acta Pediátrica Costarricense. Vol.21 n.1 San José Jan. 2009
53. Wang Lin. et al. (2011). DC-SIGN (CD209) Promoter 2336 A/G Polymorphism Is Associated with Dengue Hemorrhagic Fever and Correlated to DC-SIGN Expression and Immune Augmentation. 5(1):1
54. Protocolo para la vigilancia en salud pública del dengue. Organización Panamericana de la Salud. Instituto Nacional de Salud Republica de Colombia. Pág. 8
55. Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de dengue por laboratorio. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1ª Edición 2015. México. Pág. 21-22
56. Comunicado de Prensa. (2015). Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios. Secretaría de Salud México. Registro 105/15
57. Sabchareon. et al. (2012). Eficacia de CYD-TDV contra dengue confirmado por virología a 28 días después de tercera dosis. Lancet 380:1559–67

16. ANEXOS

Anexo 1. Hoja de recolección de datos

Con el fin de complementar los resultados de la determinación de antígeno NS1 del virus del Dengue, le solicito conteste los siguientes cuestionamientos con la mayor veracidad posible, además de ello le informo que sus datos permanecerán en confidencialidad.

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

1. NOMBRE			
2. No. TELEFONICO		3. EDAD	
3. DOMICILIO			
5. PERTENENCIA ETNICA		6. SEXO	

En el siguiente apartado marque con una X la(s) respuestas.

DATOS ESPECÍFICOS

6. ¿Ha tenido desplazamiento en los últimos 30 días?

si no

7. ¿Municipio o localidad a la que se desplazó?

8. ¿Antecedentes de dengue?

si no desconocido

9. ¿Algun familiar ha tenido antecedentes de dengue?

si no desconocido

DATOS CLÍNICOS

10. En caso de recibir una picadura de mosquito ¿presento alguno de estos síntomas?

fiebre	<input type="checkbox"/>	dolor abdominal	<input type="checkbox"/>
rash/erupción	<input type="checkbox"/>	Vomito	<input type="checkbox"/>
diarrea	<input type="checkbox"/>	Petequias	<input type="checkbox"/>
cefalea	<input type="checkbox"/>	dolor retrorticular	<input type="checkbox"/>

GRACIAS

Anexo 2. Carta de Consentimiento Informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Toluca, México, a _____ de _____ de 201____.

Nombre del paciente _____

Se le invita a participar en el proyecto de investigación “**IDENTIFICACION DEL ANTIGENO NS1 Y ANTICUERPO IgM PARA EL VIRUS DEL DENGUE EN ESTUDIANTES DE NIVEL SUPERIOR DE LA UAEMex**”

Información general:

El objetivo del estudio:

Identificar el Antígeno NS1 del virus del Dengue mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en suero de estudiantes de nivel superior de la UAEMex.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en acudir a una cita en la cual:

- Firma de carta de consentimiento informado y contestar cuestionario de factores predisponentes.
- Se me pedirá donación de muestra de sangre periférica para determinación de Ag NS1 e IgM del virus del dengue, el resto de la muestra se dispondrá de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, Clasificación y especificaciones de manejo.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- **Riesgos, inconvenientes y molestias:** El material empleado es nuevo, desechable y estéril. La toma de muestra no genera alguna intervención por parte de los investigadores que genere algún daño o lesión al paciente. Las molestias son aquellas propias del proceso al cual está solicitando.

- **Beneficios:** Se me hará entrega del resultado por escrito de los estudios en los que haya participado, así mismo, se me podrá orientar el tipo de institución de salud que pudiera atenderme.

El Investigador se ha comprometido a darme información a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que

se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Centro.

El Investigador me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial, quedando registrado con el **NÚMERO DE FOLIO _____**.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: "IDENTIFICACION DEL ANTIGENO NS1 Y ANTICUERPO IgM PARA EL VIRUS DEL DENGUE EN ESTUDIANTES DE NIVEL SUPERIOR DE LA UAEMex".

Nombre y firma del paciente

Dr. en C. Jonnathan G. Santillán Benítez

Investigador Responsable

Facultad de Química, UAEMex

Anexo 3. Autorización para realizar toma de muestra en la Facultad de Química, UAEMex



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Oficio No. 178
Subdirección Académica
03 de Abril de 2017

COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICAS, UAEM

PRESENTE:

Enviando un cordial saludo, informo a usted que la C. Anney Lillián Velázquez Flores, alumna egresada de la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo, solicita la autorización para realizar toma de muestra de sangre periférica a los estudiantes de la Facultad de Química, por lo que invita a los alumnos a participar en el proyecto de tesis que tiene por título **"Identificación del Antígeno NS₁ y Anticuerpo IgM para el Virus del Dengue en Estudiantes de Nivel Superior de la UAEMex"**.


Interesados favor de comunicarse con:

Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez	217-38-90 ext. 134
Anney Lillián Velázquez Flores	7225-63-43-55

Agradeciendo de antemano la atención que se sirva brindar al presente y sin otro particular, quedo de usted.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"


DR. ERICK CUEVAS YAÑEZ.
Subdirector Académico



C.C.P. DR. JONNATHAN G. SANTILLÁN BENÍTEZ, Profesor Investigador de la facultad de Química.
C.C.P. EXPEDIENTE.

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

Anexo 4. Carta de aceptación del protocolo por parte del Comité de Ética para la Investigación del CICMED



Universidad Autónoma del Estado de México

Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Toluca, México a 4 de agosto de 2017.

P.Q.F.B. ANNEY LILLIÁN VELÁZQUEZ FLORES

PRESENTE

Por éste conducto se le comunica que el Comité de Ética de la Investigación del CICMED en la sesión del 3 de agosto del año en curso, **acordó aprobar** el protocolo de investigación de tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, que tiene como título:

Identificación del antígeno NS1 Y anticuerpo IgM e IgG para el virus del dengue en estudiantes de nivel superior de la UAEMex.

Ya que cumple con los aspectos éticos y metodológicos acorde a la investigación científica, quedando registrada con el número **2017/05**. Dicha investigación se desarrollará bajo su responsabilidad, con el compromiso de hacer llegar al término de la misma un informe a éste Comité. Registro COFEPRIS 15CI15106014.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

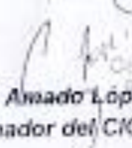
"2017, Año del Centenario de la promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Comité de Ética de la Investigación
Centro de Investigación en Ciencias Médicas

Dra. Miriam V. Flores Merino

Dra. Ma. Victoria Domínguez García

M. en C. Sandra M. López Heydeck


Dr. en E.P.J. Amado López Arriaga
Coordinador del CICMED

C.I.C. Archivo

Av. Jesús Coronado nº 205,
Col. Universidad, Toluca, Méx.
C.P. 50130
Tel. (01722) 212 8077
219 41 22

CICMED



Toluca, México a 4 de agosto de 2017.

P.Q.F.B. ANNEY LILLIÁN VELÁZQUEZ FLORES

PRESENTE

Por este conducto se le notifica que al ser aprobado su protocolo de investigación por el Comité de Ética de la Investigación del CICMED "Identificación del antígeno NS1 Y anticuerpo IgM e IgG para el virus del dengue en estudiantes de nivel superior de la UAEMex", Usted y sus tutores Dr. Jonathan G. Santillán Benítez y Dr. Enrique Morales Avila han adquirido los siguientes compromisos:

3. Para realizar cualquier modificación del protocolo aprobado, incluyendo el título, deberá someter al Comité la enmienda correspondiente para su análisis y en su caso aprobación.
4. Deberá hacer llegar al término de la investigación un informe dirigido al Dr. en C. Octavio Márquez Mendoza Presidente del CEI con firma autógrafa de los responsables de la investigación, bajo el siguiente formato:
 - ✓ Nombre del responsable del proyecto y colaboradores.
 - ✓ Fecha de aprobación y número de registro del CEI (anexar copia de la carta de aprobación)
 - ✓ Fecha de graduación (en caso de tesis) o término de la investigación.
 - ✓ Productos obtenidos (anexar documentos).

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2017, Año del Centenario de la promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

**Comité de Ética de la Investigación
Centro de Investigación en Ciencias Médicas**

Dr. en E.P. J. Amado López Arriaga
Coordinador del CICMED



Centro de Investigación
en Ciencias Médicas
UAEM

c.c.p. Dr. Jonathan G. Santillán Benítez, Tutor académico.
c.c.p. Dr. Enrique Morales Avila, Coasesor.
c.c.p. Archivo

Av. Jesús González nº 205,
Col. Universidad, Toluca, Méx.
C.P. 50130
Tel. 01722212 80 27
219 41 22

CICMED

Anexo 5. Carta de aceptación de resumen para participar en el X Congreso Nacional de Virología 2017.



Estimado Colega.

Es un placer informarle que su trabajo ha sido aceptado en su modalidad seleccionada, para ser presentado en el **X Congreso Nacional de Virología**.

Una vez las memorias estén listas con todos los trabajos, se le informara el horario de su presentación.

De antemano agradecemos su apoyo y presencia en este congreso el cual promete ser de los más exitosos.

Saludos Cordiales

Comité Organizador

**Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada -
Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva -
Dr. Carlos Sandoval Jaime -**

**CMN "20 de Noviembre", ISSSTE
FMVZ, UNAM.
IBT, UNAM**