

Artículo original

Características Viroológicas y Serológicas de Pacientes con Dengue Grave y Fallecidos por Dengue durante la Epidemia del Año 2011 en Paraguay

Serological and Virological Characteristics of Patients with Severe Dengue and Deaths by Dengue during the Epidemic of 2011 in Paraguay

Dres. Cynthia Vázquez, Shirley Villalba, Maria Liz Gamarra, Elva Oviedo, Angelica Oviedo, Maria Jose Ortega, Carmen Arellano, Wilson Paredes, Sonia Figueredo, Luis Ramirez, Juan Torales, Pamela Dunjo, Karen Nielsen, Jose Pereira, Mercedes Carrillo. Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP)

Paraguay recorded dengue epidemics since 1989, and periods of sustained viral circulation in endemic form from 2009. But the epidemic of 2011, could be considered the most severe that has hit the country, not only in numbers of reported cases, but also in the severity of clinical manifestations and the number of confirmed deaths. To describe the virological and serological features of severe dengue patients died of dengue in 2011 in Paraguay analyze 60 samples from patients with severe dengue (42 of them dead) by ff. methods: MAC-ELISA protocol (CDC), Dx Focus IgG ELISA, Biorad Platelia NS1 ELISA, virus isolation and RT-PCR protocol Harris. 58% of the cases studied were women. The most affected age group was 20 to 39 years. 70% of the studied population had antibody titers compatible with secondary dengue. The predominant serotype was the Den-2 in 80% of cases with serotype identified and Den-1 in the 20% remaining. IgM were positive in 64% of the samples analyzed. The overall sensitivity was 53% NS1 and IgM combined with up to 91%. In a dengue endemic country like Paraguay, with a high percentage of the population with secondary immune response, requires the combination of all available laboratory tools to increase diagnostic sensitivity, especially in severe and fatal cases

Keywords: *Epidemiology, ELISA, NS1*

Resumen

El Paraguay registra epidemias de dengue desde el año 1989, y periodos de circulación viral sostenida en forma endémica a partir del año 2009. Sin embargo la epidemia del año 2011, podría considerarse la más severa que ha sufrido el país, no solo en números de casos

reportados, sino también en la severidad de las manifestaciones clínicas y el número de muertes confirmadas. Con el fin de describir las características virológicas y serológicas de pacientes con dengue grave y fallecidos por dengue durante el año 2011 en Paraguay analizamos 60 muestras de pacientes con dengue grave (42 de ellos fallecidos) por los sgtes. métodos: MAC-ELISA (protocolo

CDC), ELISA IgG Focus Dx, ELISA NSI Platelia Biorad, Aislamiento viral y RT-PCR protocolo Harris. El 58% de los casos analizados fueron mujeres. El grupo de edad más afectado fue el de 20 a 39 años. El 70% de la población estudiada presentó títulos de anticuerpos compatibles con Dengue secundario. El serotipo predominante fue el Den-2 en el 80% de los casos con serotipo identificado y Den-1 en los 20% restantes. IgM resultaron positivas en un 64% de las muestras analizadas. La sensibilidad global de NSI fue de 53%, y combinada con IgM subió al 91%. En un país endémico para dengue como el Paraguay, con alto porcentaje de su población con respuesta inmunológica secundaria, se requiere de la combinación de todas las herramientas de laboratorio disponibles para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, especialmente en los casos graves y fatales.

Palabras claves: Epidemiología, ELISA, NSI

Introducción

El dengue es la enfermedad transmitida por artrópodos más prevalente en las regiones tropicales, en los últimos años su incidencia ha aumentado 30 veces, y se estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones por dengue (1).

Existen 4 tipos de virus dengue (DENV-1, -2, -3, y -4), serológicamente relacionados pero antigénica y genéticamente diferentes, causantes de enfermedad en humanos. Aunque la mayoría de las infecciones se presentan como una enfermedad febril leve y hasta asintomática, los 4 serotipos son capaces de producir la forma más grave y potencialmente fatal de la enfermedad; y complicaciones sistémicas no específicas (p.e. encefalitis, hepatitis) (1-3).

La variación de la sintomatología del dengue puede estar ocasionada tanto por factores virales como inmunológicos. (4,5) En numerosos estudios se ha observado, que infecciones secuenciales o secundarias por virus dengue, tienden a producir cuadros severos. (6-

10) Se han postulado otros factores relevantes en la patogénesis del FHD: virus de cepas específicas virulentas, (11-13) predisposición genética a enfermedad severa en ciertas poblaciones; (14,15) y otros factores de riesgo como edad, sexo y estado nutricional.(16-18) Aunque estas hipótesis no son totalmente exclusivas, y se cree que varias de ellas podrían estar involucradas en el desarrollo de formas graves de la enfermedad, ya sea que la patogénesis severa es causada por inmun-amplificación o por algún otro mecanismo, se necesitan herramientas para el diagnóstico laboratorial específico, a fin de orientar medidas apropiadas de prevención, tratamiento y control, y de mantener datos epidemiológicos precisos.

El Paraguay es un país con historia de importantes epidemias de dengue desde el año 1989 (19,20) y periodos de circulación viral sostenida en forma endémica a partir del año 2009. Sin embargo la epidemia de dengue que afectó a todo el territorio nacional durante el año 2011, puede ser considerada la más severa que ha sufrido el país, en términos no solamente de números de casos reportados (más de 50.000), sino también en cuanto a la severidad de las manifestaciones clínicas y el número de muertes confirmadas (21).

Es así que el objetivo de esta investigación fue escribir las características virológicas y serológicas de pacientes con dengue grave y fallecidos por dengue durante el año 2011 en Paraguay.

Materiales y métodos

Fueron seleccionadas 60 muestras de pacientes (42 de ellos fallecidos) con diagnóstico clínico de dengue grave según la clasificación de la OMS del año 2009 1, recibidas en el LCSP durante la epidemia de dengue del año 2011 en Paraguay. Las muestras estuvieron acompañadas de fichas clínico-epidemiológicas con los siguientes datos: identificación, sexo, edad, procedencia, síntomas clínicos, historia de viajes en las semanas previas y antecedentes de haber padecido la enfermedad anteriormente. Aunque

en algunos casos no pudimos obtener la totalidad de los datos requeridos.

La infección por dengue fue confirmada en los casos seleccionados, mediante las pruebas detalladas a continuación:

MÉTODOS SEROLÓGICOS.

ELISA de captura para anticuerpos IgM anti-Dengue (MAC ELISA). Con el protocolo del Center for Disease Control and Prevention de Puerto Rico (CDC) (22, 23), utilizando una mezcla de los cuatro antígenos de Dengue producidos en el LCSP en cerebro de ratón lactante.

Se utilizan microplacas de polivinilo recubiertas con IgG de cabra anti-IgM humana (comercial) en una dilución 1:200 con buffer Carbonato/Bicarbonato (pH 9,6), obtenidas por agregado de 100 μ L/pocillo e incubación a 4°C toda la noche. Se descarta el contenido de los pocillos, se lavan 3 veces con PBS (pH 7,4), se bloquean con 150 μ L /pocillo de PBS con 4% de albúmina bovina a 37°C por 15 minutos, se descarta el contenido y se lavan tres veces con PBS (pH 7,4). Los sueros en estudio y los controles se diluyen 1:40 con PBS con 0,5% de albúmina bovina y se cargan 50 μ L /pocillo, se incuban a 37°C por una hora, se descarta el contenido y se lavan tres veces con PBS (pH 7,4). Se prepara una mezcla (MIX) de los cuatro antígenos en proporciones determinadas por titulación de los mismos con el conjugado. Se agrega 50 μ L /pocillo de la mix de antígenos en una dilución 1:10 con PBS con 20% de suero equino normal (SEN) y se incuba a 4°C toda la noche.

Se realizan tres lavados con PBS (pH 7,4), se agrega 25 μ L /pocillo del conjugado en una dilución de 1:6000 con PBS con 20% de SHN y se incuban a 37°C por una hora. Finalmente, se realizan cinco lavados con PBS (pH 7,4), se agrega 100 μ L/pocillo de sustrato comercial ABTS (A/B), se incuban a 37°C por 15 minutos y se determina la absorbancia a una longitud de onda de 405-410 nm. Para calcular los resultados, se determina el promedio de la

densidad óptica (DO) de cada suero (las muestras deben correrse en duplicado) y se resta el promedio de la DO de los controles negativos. Un DO mayor o igual a 0,2 indica un resultado positivo.

ELISA IgG: fue realizado de acuerdo a recomendaciones del fabricante, mediante el kit comercial "Dengue Fever Virus IgG Dx Select" (Focus Diagnostics Cypress, CA, USA) para caracterizar la respuesta inmune de los pacientes como primaria o secundaria. Diluciones seriadas de las muestras de suero fueron analizadas, y aquellas con títulos equivalentes a Inhibición de la hemaglutinación (IHA) \geq 1:2560, fueron consideradas infecciones secundarias.

ELISA NS1: fue realizado para detectar proteína viral NS1 de virus dengue en muestras de todos los pacientes estudiados. Se utilizó el kit comercial "Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)" que consiste en un ELISA formato sandwich de un paso que utiliza anticuerpo monoclonal de ratón (MAb) para captura y revelación. Si el antígeno NS1 está presente en el suero, se forma un inmunocomplejo MAb-NS1-MAb/peroxidasa. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

MÉTODOS VIROLÓGICOS Y MOLECULARES

-Aislamiento viral. Inoculación de muestras de suero en cultivo de células C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* 24. Las células son crecidas a 28°C en medio MEM (Minimal Essential Medium) suplementado con 0,1% de Bicarbonato de Sodio, 100 U/ml de Penicilina, 10 μ g/ml de Estreptomina y 10% de suero fetal bovino (medio de crecimiento). Para el aislamiento se siembran las células en una concentración aproximada de 1.105 cel/ml en frascos de 25 cm² y se incuban a 28°C por 24 a 48 horas.

Una vez formada la monocapa, se descarta el sobrenadante y se agrega 2 ml de medio con 2% de suero fetal bovino (medio de mantenimiento) y 50 μ L del suero del paciente

en el lado opuesto de la monocapa para mezclarlo con el medio antes de bañar las células. Después de la adsorción de una hora a 28°C se agregan 5 ml de medio de mantenimiento. Las células infectadas se mantienen a 28°C durante 7 días y se observan diariamente para detectar algún efecto citopático (ECP). Se descarta el medio, se agrega medio de mantenimiento nuevo y se incuba a 28°C hasta el 14° día. Se cosechan las células y se realiza la inmunofluorescencia indirecta para la identificación del aislamiento.

-Inmunofluorescencia indirecta. Para tipificación de los virus aislados, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada uno de los serotipos del virus Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) 24, provistos por FIOCRUZ, RJ Brasil.

La suspensión celular obtenida se distribuye sobre las láminas, se secan a temperatura ambiente, se fijan con acetona fría a -20°C durante 15 minutos y se secan a temperatura ambiente. Sobre la muestra fijada se agregan los anticuerpos monoclonales anti DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 en una dilución 1:10 y se incuban a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda. Se realizan dos lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) de pH 7,6 y se secan a temperatura ambiente. Se agrega el conjugado (Flourescent goat anti-mouse Gamma Globuline for indirect flourescent testing), se incuba a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda, se realizan dos lavados con PBS y se deja secar a temperatura ambiente. Sobre la lámina se añade una pequeña cantidad de glicerina-PBS (1:10) y se coloca el cubre-objeto. Finalmente, se observan las láminas bajo un microscopio para flourescencia y se valoran las muestras positivas y negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles que deben incluirse en cada experiencia. La florescencia específica se describe como citoplasmática, perinuclear.

Extracción de ARN viral: el ARN viral fue extraído a partir de cada muestra clínica o aislado, utilizándose el reactivo TRIZOL Reagent (Invitrogen-Life Technologies), para ello

se ha adicionado 120µL de muestra a 375 µL de trizol. Esta suspensión, después de un periodo de incubación a temperatura ambiente fue centrifugada a 12000 rpm a 4°C, durante 10 minutos. Luego, se adicionaron 100 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich®) para la separación de fases y se sometió a una segunda incubación y centrifugación para la precipitación del ARN viral. En la siguiente etapa fue desechada la fase acuosa y se adicionó 1mL de etanol al 75%, se mezcló y centrifugó nuevamente a 12000 rpm a 4°C, durante 5 minutos. Finalmente, después de eliminar el etanol residual se dejó secar el precipitado y se resuspendió el material seco con 50 µL de agua libre de RNAsas.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR):

Para la detección y tipificación de virus dengue en muestras originales y sobrenadantes del primer pasaje en cultivo celular, fue realizada mediante 2 protocolos diferentes: una RT-PCR en un solo paso de acuerdo al protocolo descrito por Eva Harris et al.²⁵, y una nested PCR según protocolo de Morais Bronzoni et al. (26)

Resultados

Durante la epidemia de dengue del año 2011 en Paraguay, se realizó en el LCSP la confirmación laboratorial de infección por dengue en más de 5000 muestras de casos sospechosos, entre ellos lograron ser identificados 60 casos de dengue grave (42 de ellos fallecidos), los cuales fueron objeto del presente estudio. En la Tabla 1 se muestran las características demográficas e inmunológicas de los pacientes estudiados. El 58 % de los pacientes de clasificados como dengue grave, fueron mujeres. La mediana de edad fue de 58 años (rango de 0 a 89 años), siendo el grupo de 20 a 39 años el más afectado, seguido por el de 60 años y más (Gráfico 1). El 70 % de los pacientes estudiados presentaron un patrón de respuesta secundaria de anticuerpos contra dengue, característica predominante en todos los grupos de edades. La mayoría de los casos

provenían del Departamento Central y de la Capital (Gráfico 2). No fue posible acceder a muestras de fallecidos con sospecha de dengue

en servicios de salud privados, principalmente los de la X Región Sanitaria.

Tabla 1. Características demográficas e inmunológicas de pacientes estudiados. Año 2011

Variable	Nº de Casos (%)
Sexo	
Masculino	25 (42)
Femenino	35 (58)
Edad	
mediana /rango	58/(0 -89)
Región Sanitaria	
II	2 (3)
IV	2 (3)
V	1 (2)
X	5 (8)
XI	24 (40)
XVII	3 (5)
XVIII	23 (39)
Respuesta Inmunológica	
primaria	14 (23)
secundaria	42 (70)
no determinado	4(7)

Figura 1. Distribución de casos confirmados de dengue grave primario y secundario por grupos de edades. Año 2011

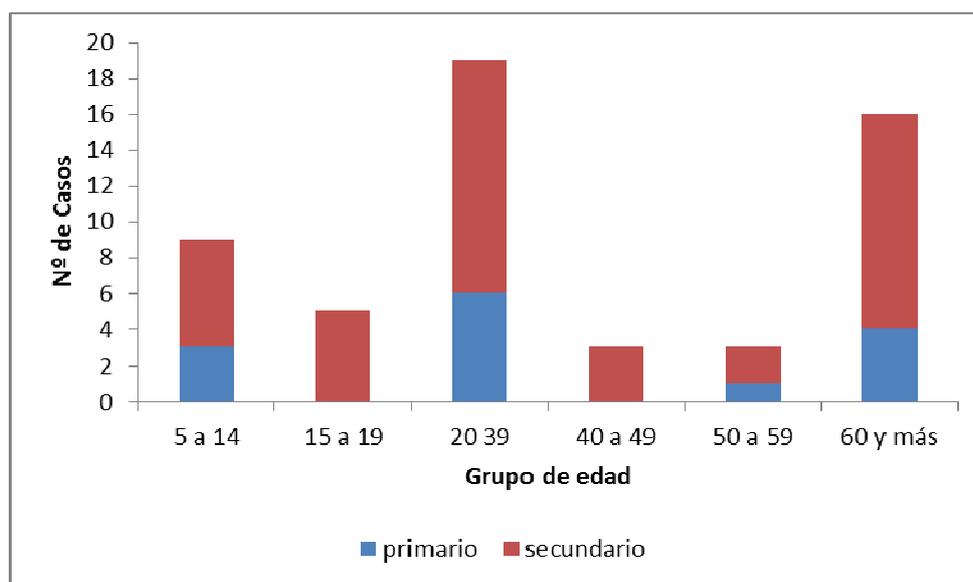
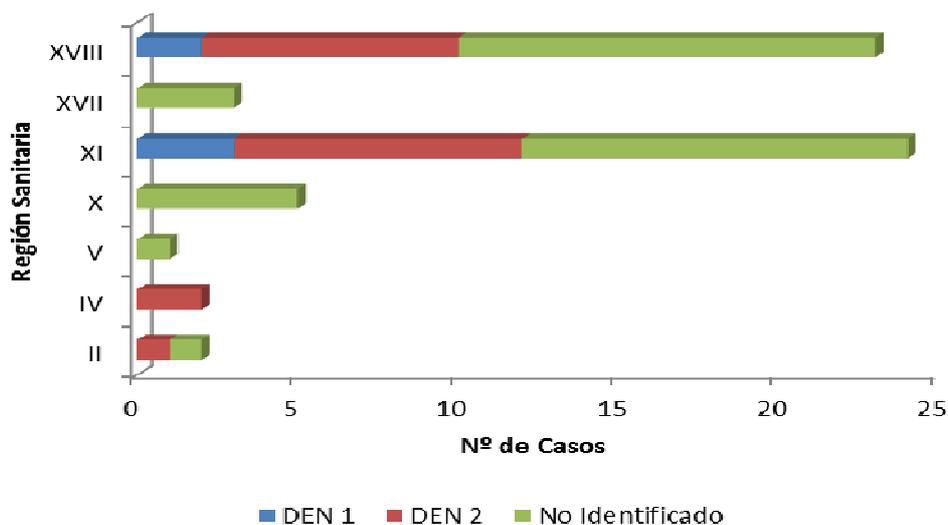


Figura 2. Distribución de casos confirmados de dengue grave según región sanitaria. Año 2011



El 53% de las muestras recibidas provenían de pacientes con más de 5 días de evolución, el 33% de pacientes de 1 a 5 días de evolución y en el 14 % restantes no se obtuvieron datos en cuanto días de evolución. En la mayoría de los casos fueron realizadas todas las pruebas disponibles, pero en algunos, la muestra no fue suficiente y se priorizaron las pruebas más recomendadas según la etapa de toma de muestra. En la Tabla 2 se resumen los resultados de las pruebas realizadas.

En el 44 % (25/56) de los pacientes con muestra disponible pudo ser identificado el serotipo de dengue, entre los cuales el más frecuente fue el DENV-2, siendo causante del 80% de los casos identificados, mientras que el DENV-1 fue responsable del 20% restante.

Fue realizada la detección de anticuerpos tipo IgM en el 64% (36/56) de las muestras testadas. La prueba de detección de Antígeno NS1 resultó positiva en 28 de las 53 muestras analizadas, arrojando una sensibilidad global de 53% comparada con el conjunto de las demás pruebas realizadas, de los 25 casos confirmados por otras pruebas y que resultaron negativos para NS1, 21 correspondieron a casos de dengue secundario. La sensibilidad del ELISA NS1 para el diagnóstico de los pacientes estudiados, fue de 62% (8/13) en los casos de dengue primario, y de 45% (18/40) en los casos de dengue secundario. Comparada con la RT-PCR la sensibilidad de la detección de NS1 fue del 68% (17/25), de las 8 muestras negativas, 5 correspondieron a casos de dengue secundario. La combinación de las detecciones de IgM y antígeno elevó la sensibilidad del diagnóstico a 91%.

Tabla 2. Resultados de pruebas virológicas y serológicas realizadas según días de evolución de pacientes. Año 2011

Días de evolución	IgM			NS1			RT-PCR/Aislamiento			
	Neg	Pos	NR	Neg	Pos	NR	DEN 1	DEN 2	Neg	NR
>5	8	23	1	17	11	4	2	9	18	3
1 a 5	9	8	3	5	13	2	3	9	8	
SD	3	5		3	4	1		2	5	1
Total general	20	36	4	25	28	7	5	20	31	4

Neg = Negativo; Pos = Positivo; NR = No Realizado

La mayoría de los casos de dengue grave y fatales, se registraron entre las semanas epidemiológicas 13 a 18 (Gráfico 3), lo que corresponde a la fase de descenso de la curva

epidémica del dengue en el año 2011 (Gráfico 4).

Figura 3. Distribución de casos confirmados de dengue grave y fallecidos por semana epidemiológica. Año 2011

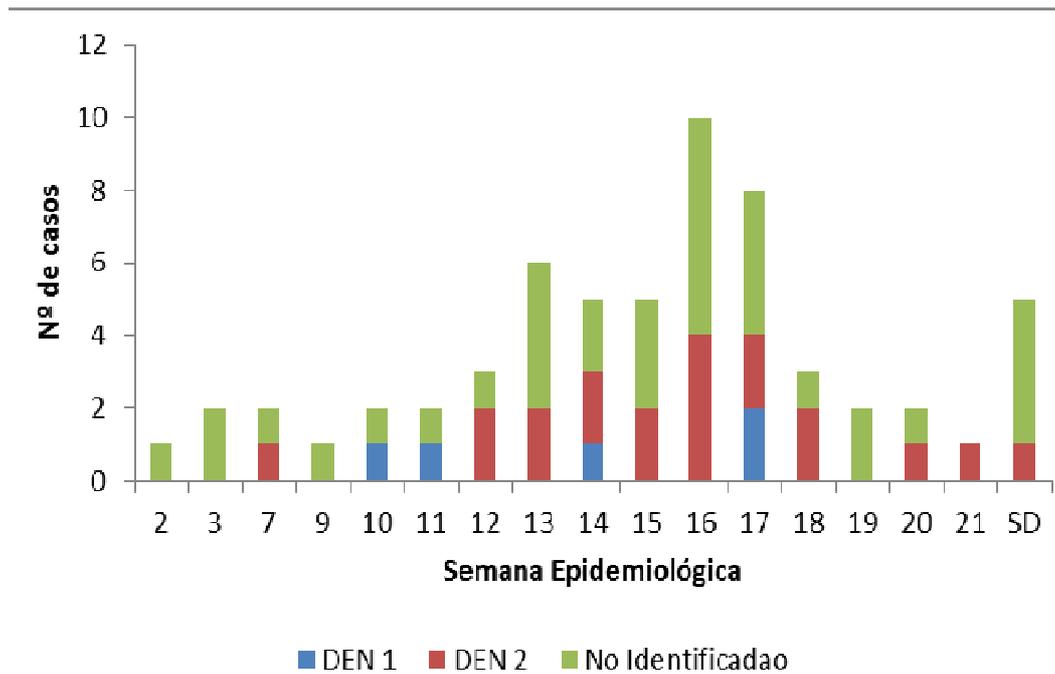
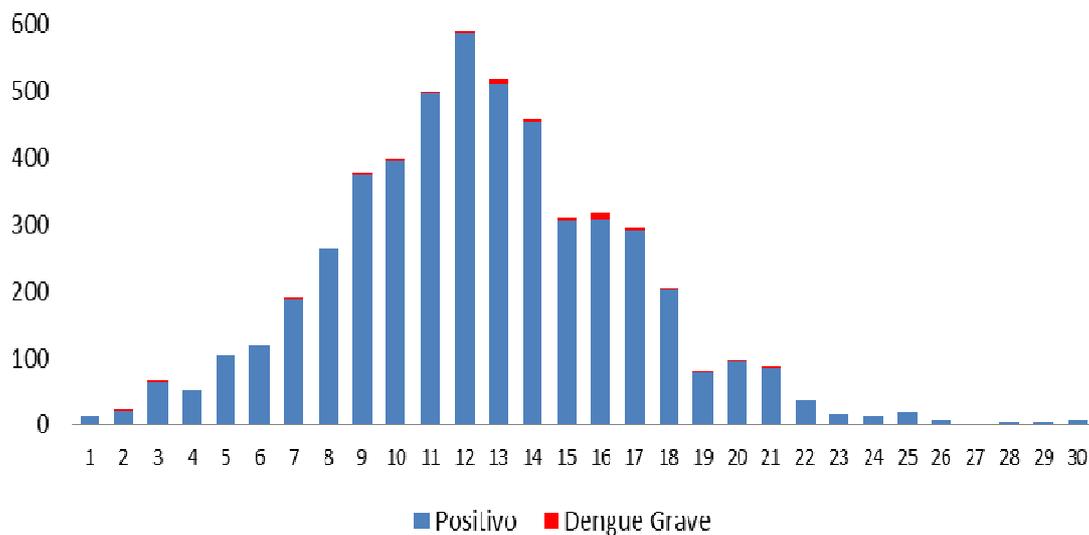


Figura 4. Total de casos de Dengue confirmado por laboratorio. Año 2011



Los signos y síntomas más comúnmente encontrados, se detallan en la Tabla 3. La

presencia de signos de alarma se constató en más del 50% de los casos analizados.

Tabla 3. Características Clínicas de los pacientes estudiados. Año 2011

Síntomas	Frecuencia	Signos	Frecuencia
Fiebre	83%	Petequias	20%
Cefalea	72%	Oligoanuria	17%
Mialgia	68%	Epistaxis	13%
Artralgia	60%	Gingivorragia	12%
Nausea	55%	Inyeccion conjuntival	12%
Dolor Abdominal	52%	Edema Bipalpebral	12%
Vómitos	48%	Ictericia	8%
Exantema	15%	Hepatomegalia	8%
Tos	13%	Esplenomegalia	7%
Prurito	7%	Hemoptisis	5%
Taquipnea	20%	Hematemesis	3%

Discusión y Conclusión

A diferencia de otras enfermedades virales auto limitadas, la infección por dengue puede convertirse en pocos días en la forma grave que pone en peligro la vida. Por este motivo, es deseable contar con un diagnóstico precoz, así como con marcadores potenciales que puedan predecir el riesgo de evolución posterior a la forma grave a fin de mejorar el manejo clínico de la infección por dengue. Esto podría reducir el uso innecesario de antibióticos, la hospitalización de los pacientes con enfermedades más leves en países con recursos limitados y permiten la hospitalización temprana y tratamiento de soporte de aquellos que estarían desarrollando el potencialmente mortal dengue grave (27).

Reportamos aquí las características virológicas y serológicas observadas en 60 casos clasificados como dengue grave durante la epidemia de dengue del año 2011 en Paraguay. Como era de esperar y ya se ha descrito ampliamente (4, 28-30), los casos de dengue grave fueron más frecuentes en la infección secundaria. El serotipo más prevalente en los casos graves observados en nuestro estudio fue el DENV-2, lo que coincide con datos

publicados previamente por Vaughn et al. (28) que informó que el DENV-1 causó derrame pleural menos grave que las infecciones secundarias por DENV-2, pero no menos que con DENV-3 y DENV-4. Existen además otras investigaciones que reportan mayor severidad de las infecciones, cuando el DENV-2 es el segundo serotipo infectante en casos de dengue secundario, mientras que describen casos leves en las primoinfecciones por este serotipo (31,32).

La detección de la proteína NS1 del virus dengue por ELISA o métodos inmunocromatográficos, se convirtió en la prueba más popular para el diagnóstico precoz del dengue en los últimos años (33-37). La modesta sensibilidad global de la prueba, reportada aquí (53%), se debe probablemente a la gran cantidad de infecciones secundarias (70%) lo que refleja la verdadera situación en Paraguay y otros países hiperendémicos para dengue. De hecho, se registró una menor sensibilidad de la prueba ELISA NS1 en las infecciones secundarias en comparación con las infecciones primarias (45% vs 62%). Los anticuerpos anti-NS1 son más frecuentes en la infección secundaria del dengue³⁰ y el complejo antígeno-anticuerpo

impide la capacidad de la prueba para detectar NS1 libre (38-39).

Cuando el ensayo de antígeno NS1 se acopló con el MAC-ELISA, la sensibilidad aumentó al 91%. Esta combinación de la prueba de detección de antígeno NS1 y detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico del dengue mostró una mayor sensibilidad que la RT-PCR sola y que la detección de IgM sola. Cuando se realiza en conjunto, la detección de NS1 e IgM parece ser muy sensible y complementarias, lo que permite un suficientemente buen diagnóstico durante la fase aguda y la fase de convalecencia de la enfermedad. Esta ventaja de la combinación fue positivamente demostrada en un estudio multicéntrico por Guzman et al. (40).

Ninguna de las pruebas virológicas o serológicas realizadas en este estudio, pudo detectar en forma individual el 100% de los casos estudiados, en conclusión, en un país endémico para dengue como el Paraguay, con alto porcentaje de su población con respuesta inmunológica secundaria, se requiere de la combinación de todas las herramientas de laboratorio disponibles para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, especialmente en los casos graves y fatales.

Referencias

1. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 2009. New Edition.
2. Duong V, Vong S, Buchy P. [Dengue and other arboviral diseases in South-East Asia]. *Med Trop (Mars)* 2009 69: 339–344.
3. Solomon T, Mallewa M. Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* 2001 42: 104–115.
4. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239:476–81.
5. Rosen L. “The emperor’s new clothes” revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26:337-343.
6. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38:172–80.
7. Halstead SB, Nimmannitya S, Yamarat C, Russell PK. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. *Jpn J Med Sci Biol* 1967; 20:96–103.
8. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970; 42:311–28.
9. Russell PK, Yuill TM, Nisalak A, Udomsakdi S, Gould D, Winter PE. An insular outbreak of dengue hemorrhagic fever. II. Virologic and serologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1968;17:600–8.
10. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, et al. , Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I: the 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120:653–69.
11. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever: a critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J* 1986; (Suppl):40–2.
12. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230:244–51.
13. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73:4738–47.
14. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1981;30:1100–5.
15. Bravo Gonzalez JR, Guzman Tirado MG, Kouri Flores G. Encuesta seroepidemiologica retrospectiva a virus dengue en el municipio Cerro. *Metodologia. Rev Cubana Med Trop* 1985;37:259–68.
16. Guzman MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernandez A. A study of fatal hemorrhagic

- dengue cases in Cuba, 1981. Bull Pan Am Health Organ 1984;18:213–20.
17. Anto S, Sebodo T, Sutaryo, Suminta, Ismangoen. Nutritional status of dengue haemorrhagic fever in children. Paediatrics Indonesia 1983;23:15–24.
 18. Thisyakorn U, Nimmannitya S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. Clin Infect Dis 1993;16:295–7.
 19. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. La epidemia de dengue del 99. Ed. Páez M. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Año 5 N° 17 1999:1-4
 20. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Vigilancia epidemiológica del Dengue en el Paraguay. Ed. Páez M. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Año 8 N° 24 2002: 1-4
 21. Boletín epidemiológico y semanal. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2011 Octubre N°39.
 22. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 418-27.
 23. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. J Virol Methods 1991; 33: 101-13
 24. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 158-65.
 25. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaceda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 1998;36(9): 2634-2639.
 26. de Morais Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):696-702.
 27. Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, Lundkvist A, Leparco-Goffart I, Deubel V, Vong S, Buchy P. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jul;5(7):e1244. Epub 2011 Jul 19.
 28. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, et al. (2000) Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J Infect Dis 181: 2–9.
 29. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, et al. (2000) Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. Am J Epidemiol 152: 793–799; discussion 804.
 30. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, et al. (2003) Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. J Clin Microbiol 41: 4154–4159.
 31. Sierra B, Perez AB, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, Aguirre E, Alvarez M, Kern F, Kourí G, Volk HD, Guzman MG. Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? Cell Immunol. 2010;262(2):134-40. Epub 2010 Feb 10.
 32. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. Viruses. 2010 Dec;2(12):2649-62. Epub 2010 Dec 8
 33. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes M, Rodrigues S, Storck-Herrmann, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clinical and Vaccine Immunology 2006; 13:1185-1189.
 34. Kumarasamy V, Chua SK, Hassan Z, Wahab AHA, Chem YK, Mohamad M. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. Singapore Med J 2007; 48(7):669-673.

35. Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, et al. (2008) Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 387–391.
36. Blacksell SD, Mammen MP Jr., Thongpaseuth S, Gibbons RV, Jarman RG, et al. (2008) Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 43–49.
37. Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, et al. (2010) Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis* 10: 142.
38. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, et al. (2002) High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 186: 1165–1168.
39. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38: 1053–1057.
40. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, et al. (2010) Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
-

Solicitud de Sobretiros:

Dra. Cynthia Vazquez

Laboratorio Central de Salud Pública

cynthiavlm@yahoo.com