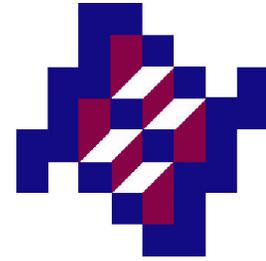


**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
PÚBLICA
CENTRO REGIONAL DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA**



CORRELACIÓN CLÍNICA Y SEROTIPIFICACIÓN VIRAL EN UN BROTE DE DENGUE EN LA COSTA DE CHIAPAS

**Presenta
Julio César Jan Gómez**

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Enfermedades
Trasmitidas por Vector**

28 de Febrero de 2014

Director De Tesis: Dr. Rogelio Danís Lozano
Centro Regional de Investigación en Salud Pública / Departamento de Control de Vectores

Asesor: Dr. José Ramos Castañeda
Centro de Investigación Sobre enfermedades Infecciosas / Departamento de Inmunología

Asesor: Med. Eric Saúl Raga Sarabia
Med. Esp. En Med. Crítica / CMN "Adolfo Ruiz Cortines" IMSS - Veracruz

Asesor: Mb. Iliana Rosalía Malo García
Centro Regional de Investigación en Salud Pública / Laboratorio de Arbovirus



RESUMEN

La enfermedad de dengue es de distribución mundial. Existen más de 500 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad en el mundo. En México es endémica en algunas entidades principalmente en el sur y sureste del país. Producida por virus del género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae* que, a la vez, pertenece al grupo de los Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Las partículas virales contienen ARN de cadena simple, son envueltas y tienen aproximadamente 40-50 nm de diámetro y consta de 4 serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Cada serotipo proporciona inmunidad específica e inmunidad cruzada a corto plazo existiendo variación genética dentro de los serotipos, algunas de las cuales parecen ser más virulentas y con mayor potencial epidémico. Contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, una membrana de doble capa derivada del huésped y una copia única de un genoma de ARN de polaridad positiva. El genoma está hendido por proteasas virales y del huésped en tres proteínas estructurales (cápside, C, prM, el precursor de membrana, M, proteína y envoltura, E) y siete proteínas no estructurales. Existen distintos genotipos o linajes (virus muy relacionados en la secuencia de nucleótidos) dentro de cada serotipo, lo que destaca la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue. La selección parece ser un tema dominante en la evolución del virus del dengue pero de manera tal que solamente se mantienen los virus que son "adecuados" tanto para seres humanos como para los vectores. Entre ellos, los genotipos "asiáticos" de DEN-2 y DEN-3 se asocian con frecuencia a infecciones concomitantes graves. También se ha descrito diversidad viral en un mismo huésped (cuasi especie) en casos humanos. Es una sola enfermedad con espectro clínico diferente, clasificándose en fiebre por dengue (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (FCHD) de acuerdo a la sintomatología, de ello dependerán los datos clínicos, la evolución y/o complicaciones. En nuestro país desde el 2006 el serotipo dominante es el DENV-1, sin embargo actualmente circulan los cuatro serotipos con predominancia del DENV-1 que concentra el 56% de los casos, seguido por el DENV-2 con el 43% y el restante 1% por los DENV-3 y 4. El DENV-2 se encuentra en 12 estados del centro y sur del país; dichas entidades concentran 98% de los aislamientos. Cada serotipo es capaz de producir manifestaciones clínicas variadas con diferencias genotípicas, ello dependerá del tiempo de evolución, comorbilidades y grupos de edad, así como estado inmunológico al momento de enfermarse. El presente estudio pretende correlacionar las manifestaciones clínicas, laboratorio y gabinete con el serotipo afectado, y con ello coadyuvar en la identificación de datos clínicos por serotipo circulante, e identificar patrones de cambio en caso de presentarse.



Tabla de contenido

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
Carga de dengue	4
Dengue en México	5
Transmisión.-	6
Fisiopatología del Dengue.-	6
Diferencias clínicas por serotipos.-	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
MARCO CONCEPTUAL	9
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS.....	12
GENERAL.....	12
ESPECÍFICOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Información de casos y tomas de muestras	13
Detección virológica	13
Análisis de resultados.....	17
Contexto general de los datos.-.....	17
Descripción de la población en estudio.....	20
Descripción de los estudios de gabinete	23
Discusión	27
Conclusiones	29
Perspectiva de investigación	30
BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31



INTRODUCCIÓN

El dengue es una infección transmitida por mosquitos que se presenta en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En años recientes, la transmisión ha aumentado de manera predominante en zonas urbanas y semiurbanas y se ha convertido en un importante problema de salud pública.

El dengue grave (conocido anteriormente como dengue hemorrágico) fue identificado por vez primera en los años cincuenta del siglo pasado durante una epidemia de la enfermedad en Filipinas y Tailandia. Hoy en día, afecta a la mayor parte de los países de Asia y América Latina y se ha convertido en una de las causas principales de hospitalización y muerte en los niños de dichas regiones.

Hasta hace unos meses se conocían solo cuatro serotipos distintos virales pero estrechamente emparentados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4; durante La 3ª Conferencia Internacional sobre el Dengue y Dengue hemorrágico el Dr. Nikos Vasilakis, virólogo de la University of Texas Medical Branch en Galveston informó sobre el aislamiento de un nuevo serotipo selvático, el DEN-5, de muestras procedentes de un brote de 2007 ocurrido en Malasia **(1)**, hasta ahora filogenéticamente distinto a los otros 4 serotipos conocidos, presumiblemente circulando en macacos (*Macaca mulatta*). Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo en particular. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal. Las infecciones posteriores causadas por otros serotipos aumentan el riesgo de padecer el dengue grave.

Carga de dengue

En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Más de 2,500 millones de personas —más del 40% de la población mundial— están en riesgo de contraer el dengue, y se calcula que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones por el virus del dengue en el mundo. En 2008, en las regiones de las Américas, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental se registraron en conjunto más de 1.2 millones de casos, y en 2010, más de 2.2 millones. En fecha reciente el número de casos notificados ha seguido aumentando. En 2010, se notificaron 1.6 millones de casos tan solo en la Región de las Américas; 49,000 de ellos fueron de dengue grave. Además de que el número de casos aumenta a medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas, se están produciendo brotes epidémicos de carácter explosivo. Cada año, unas 500,000 personas que padecen dengue grave —niños en una gran proporción— necesitan hospitalización, aproximadamente un 2.5% fallece (OMS). **(2)**



Dengue en México

En México se cuenta con registro del dengue desde 1941 con una tasa de 34.4 casos por cada 100,000 habitantes, descendiendo paulatinamente hasta 1963, con un recrudescimiento a finales de los años setenta, ligado a cambios en los escenarios sociales, políticos y económicos, así como los desplazamientos de poblaciones rurales a centros urbanos. Se documentó su re-introducción al país a finales de los setentas por la ciudad de Tapachula, para 1994 ya afectaba a 29 Entidades Federativas. La encuesta serológica de la Dirección General de Epidemiología (DGE) de 1986 mostraba la prevalencia promedio de anticuerpos contra virus dengue en Chiapas del 50%, en Oaxaca 62%, Guerrero 46% y en Michoacán 62%, con un panorama de serotipos circulantes en el país de los años 1978-1994 incompleto debido al desconocimiento en esos años sobre la introducción de serotipos por áreas. El Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), identificó el serotipo 1 hasta 1982, en Veracruz, después de tres años de intensa transmisión en la región sur del país; el serotipo 4 en Oaxaca, en 1983 asociado a una epidemia importante en Yucatán y en 1984, donde además se presentaron los primeros casos de dengue hemorrágico en la zona. El serotipo 2 se aisló en Guerrero en 1983. **(3)**

Existen estudios sobre los cambios climáticos y su participación en la dinámica de transmisión del dengue en México; en modelos comparativos entre fenómenos naturales como El Niño y los casos observados en estados del centro, sur y sureste de México durante más de una década entre los años de 1985 y 2007 mostraron una correlación entre los periodos de mayor humedad y calor que entre los periodos intermedios del fenómeno. **(4)**

En otro estudio realizado en el estado de Veracruz con datos de 1995 a 2003 se encontró que un aumento de cada grado centígrado en la temperatura de la superficie del mar siguió un 46% más de casos de dengue ($p = 0.001$) y 42% ($p = 0.002$) en los municipios de San Andrés Tuxtla y Veracruz, 16 y 20 semanas después respectivamente. **(5)**

Durante el 2009 el InDRE analizó 6,336 muestras, de éstas en el 46.6% identificó el serotipo DENV-1 que predominó sobre el serotipo DENV-2, el serotipo DENV-3 sólo se identificó en dos casos en Guerrero y el serotipo DENV-4 en un caso en Chiapas. En 2010 la misma institución analizó 2,013 muestras identificando algún serotipo en 79.8% siendo el serotipo DENV-1 el que predominó en todo el país. En Chiapas se identificaron los serotipos DENV-1, 2 y 4 y en Jalisco los serotipos DENV-1 y 3. Además, se identificó la circulación del serotipo DENV-3 en Guerrero y apareció el serotipo DENV-4 en San Luis Potosí. **(6)**



Transmisión.-

El vector principal del dengue es el mosquito *Aedes aegypti*. El virus se transmite a los seres humanos por la picadura de mosquitos hembra infectadas. Tras un periodo de incubación del virus que dura entre 4 y 10 días, un mosquito infectado puede transmitir el agente patógeno durante toda la vida. Las personas infectadas son los portadores y multiplicadores principales del virus, y los mosquitos se infectan al picarlas. Tras la aparición de los primeros síntomas, las personas infectadas con el virus pueden transmitir la infección (durante 4 o 5 días; 12 días como máximo) a los mosquitos *Aedes*.

El mosquito *Aedes aegypti* vive en hábitats urbanos y se reproduce principalmente en recipientes artificiales. A diferencia de otros mosquitos, este se alimenta durante el día; los periodos en que se intensifican las picaduras son el principio de la mañana y el atardecer, antes de que oscurezca. En cada periodo de alimentación, el mosquito hembra pica a muchas personas. **(2)**

Las localidades repetidoras de dengue en la actualidad son principalmente centros urbanos, con baja marginación y extensa dotación de servicios públicos y en las áreas rurales la transmisión es ocasional, con presencia de un umbral de población indispensable para que el dengue se mantenga presente. **(7)**

Sin embargo tenemos que considerar que pueden ocurrir infecciones continuas por dengue sin epidemia aparente, durante este periodo el cuadro clínico podría considerarse como indicador de posible transmisión, **(8)** Inclusive considerar comorbilidades durante una transmisión epidémica como leptospirosis, en lugares con convivencia con perros, ratas, cerdos y vacas **(9)**.

Fisiopatología del Dengue.-

Las hipótesis actuales sobre la patogénesis del virus del dengue (DENV) incluyen el tropismo viral, patologías previas de los órganos blanco, virulencia del virus, activación del sistema de complemento, inmunidad transitoria, factores genéticos del hospedero, mejora de los anticuerpos dependientes, respuesta cruzada de células T y factores solubles (relacionados a citoquinas e interleucinas). **(10)**

Existen otras hipótesis sobre la fisiopatología del dengue derivadas de estudios realizados en regiones y países donde el dengue es endémico, entre ellas las dependientes de anticuerpos, de células mediadoras, un fenómeno llamado tormenta dependiente de citoquinas y factores genéticos individuales, diferencias en las cepas virales, niveles de



viremia circulantes individuales en la fase aguda de la enfermedad, nivel nutricional, todo ello observado la mayoría en modelos experimentales realizados en animales. Adicionalmente existen factores aun sin estudiar a detalle, entre los que se incluye a factores hipertérmicos, estado físico de los individuos infectados relacionados a la viremia, condiciones de anticuerpos neutralizantes durante la infección, factores de transmisión en los vectores y sobre la respuesta inmune innata. **(11)**

Diferencias clínicas por serotipos.-

Se ha propuesto que existen factores virales que influyen la severidad de la enfermedad, aunque los marcadores de la virulencia nunca han sido identificados para el virus dengue (DENV), existe evidencia, por ejemplo de las diferencias fenotípicas y genotípicas en el conteo plaquetario, el cual podría no correlacionarse al compararse adultos y niños ya que producen formas clínicas diferentes, observándose en la cinética de la replicación en humanos y respuesta de la apoptosis en los mosquitos, tanto en presentaciones clínicas de fiebre por dengue como fiebre hemorrágica por dengue, e involucrando aminoácidos residuales de membrana, envoltura y genes no estructurales. **(12)** Incluso en estudios in vivo en ratones infectados con el serotipo DENV-1 que proviene de pacientes con síndrome de Choque por Dengue (SCHD), puede diferenciarse características fenotípicas de los observados en muestras que provienen de casos de FD y FHD, además de una sobrevivida in vitro más larga y neuroinvasión más extensa **(13)**.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue continúa siendo un problema de salud pública, en México se tiene evidencia de la co-circulación de los cuatro serotipos de dengue a lo largo de más de una década de aislamientos con espectros clínicos de una sola enfermedad diferenciados como fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por dengue y síndrome de choque por dengue. La dominancia de ciertos serotipos en forma lápsica con la presencia de manifestaciones clínicas diferentes, sugiere sintomatología diferente por serotipos, sin embargo, la información pertinente a los casos con respecto a su correlación clínica, de laboratorio y gabinete no ha sido estudiada en conjunto, la información de que disponemos en la actualidad es disgregada, y no existen estudios relacionados al genotipo complementario a lo anterior. Chiapas es en el presente año la única Entidad Federativa que ha documentado la circulación de los cuatro serotipos sin que hasta la fecha se haya logrado establecer una



correlación clínica con los genotipos circulantes, predominando el serotipo 1, los serotipos 2 y 3 son los considerados potencialmente epidémicos aun sin repuntar, sin embargo la dominancia del serotipo 1 se ha documentado en nuestro país desde 2006, siendo el periodo aproximado de permanencia de aproximadamente 6 años en esta situación. De cambiar el serotipo y/o genotipo circulante es de esperar cambios en las presentaciones clínicas, tal como se ha documentado en otros países.

Por lo anterior planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen diferencias clínicas provocadas por la diferencia de serotipos de virus dengue?

La respuesta, se vendrá a sumar a la caracterización clínica temprana en la identificación de los casos, con ello, se pretende apoyar al diagnóstico, alertar al personal de salud ante cambios del serotipo y/o genotipo circulante.



MARCO CONCEPTUAL

El DENV pertenece al género Flavivirus de la familia Flaviviridae y tiene cuatro serotipos (DENV-1 a 4); de alrededor de 40 a 50 nm de diámetro, es esférico y tiene bicapa lipídica, contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, una membrana de doble capa derivada del huésped y una copia única de un genoma de ARN de polaridad positiva. El genoma está hendido por proteasas virales y del huésped en tres proteínas estructurales (cápside, C, prM, el precursor de membrana, M, proteína y envoltura, E) y siete proteínas no estructurales. Distintos genotipos o linajes (virus muy relacionados en la secuencia de nucleótidos) dentro de cada serotipo, lo que destaca la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue. La selección parece ser un tema dominante en la evolución del virus del dengue pero de manera tal que solamente se mantienen los virus que son "adecuados" tanto para seres humanos como para los vectores. Entre ellos, los genotipos "asiáticos" de DEN-2 y DEN-3 se asocian con frecuencia a infecciones concomitantes graves. También se ha descrito diversidad viral en un mismo huésped (cuasiespecie) en casos humanos. **(14)**

Los cuatro serotipos de DENV endémicos se desarrollan independientemente de sus ancestros selváticos con evoluciones y ecologías distintas de sus predecesores por desarrollo evolutivo y adaptativo, con capacidades de virulencia diferentes de un mismo serotipo como lo observado en el serotipo 2 con genotipos diferentes entre los que se presentan en el Suroeste de Asia con su variante Americana, sin embargo Vasilakis sugiere que cepas americanas endémicas y selváticas han mantenido o recuperado el fenotipo ancestral. **(15)**

Los estudios han demostrado que la tasa de replicación de la variante del Sureste Asiático es casi dos veces mayor que la de la variante Americana y también que la primera desplaza a la segunda durante una co-infección de mosquitos de laboratorio. El estudio del genoma de los DENV en relación con su comportamiento biológico ha llevado a observaciones desconcertantes. Por ejemplo, los DENV-2 de ciclo selvático tienen tasas de replicación similares a las de los DENV-2 americanos, un hallazgo singular porque se suponía que los DENV de origen selvático no contribuían a la transmisión del dengue; por lo tanto, los virus del ciclo selvático pueden desplazarse al ciclo endémico-epidémico con facilidad, con consecuencias considerables para la salud pública. **(16)**

Por grupo de edad las manifestaciones por serotipo 2 han dado cuenta de mayor severidad en edades tempranas, con manifestaciones clínicas diferentes del serotipo dominante en pacientes hospitalizados con cambios clínicos en edades adultas, siendo sus



principales manifestaciones la permeabilidad vascular, hemorragias internas, trombocitopenia marcada o choque. **(17)**

En adultos el serotipo 3 puede producir un conteo plaquetario \leq a 50,000 plaquetas, iniciándose de forma posterior al periodo febril, con cambios anormales en las enzimas hepáticas llegando a ser superiores a 3 veces los valores normales. **(18)**

Al compararse grupos adultos y edades pediátricas podría no correlacionarse los recuentos plaquetarios y las diferentes manifestaciones de sangrado hasta después de niveles de $<20,000$ plaquetas por microlitro. **(19)**

En un brote en Taiwán, Tsai comparó las diferencias clínicas entre el DENV2 y DENV3 encontrado correlaciones significativas para el DENV 3 con la gravedad de la presentación ($p=0.011$), rash cutáneo ($p<0.001$), ascitis ($p=0.04$) además de la fiebre ($p=0.003$), conteos plaquetarios bajos y tiempos de coagulación alterados en etapas tempranas de la enfermedad y en casos primarios ($p<0.001$), sin embargo no encontró diferencias en los días de estancia hospitalaria. **(20)**

En brotes, los casos secundarios varían según el serotipo dominante, se ha documentado para el serotipo 3 una proporción del de 65 al 82.5% en personas con fiebre hemorrágica por dengue **(18, 21)**

Balsameda, en Nicaragua, halló en dos años de seguimiento dos serotipos predominantes distintos: DENV 1 y DENV 2; con DENV 2 encontró casi dos veces más casos de síndromes de choque por dengue (OR 1.91, IC 95% 1.35-2.71), así como hemorragias internas (OR 2.05, IC 1.16-3.78) y en pacientes con DENV 1 observó mayor permeabilidad vascular (OR 2.36, IC 1.80-3.09), mayor hospitalización de casos primarios (OR 3.86, IC 2.72-5.48) además de manifestaciones severas en mayor número (OR 2.93, IC 2.00-4.28). **(22)**

En un estudio multicéntrico reciente llevado a cabo en Perú, Bolivia, Ecuador y Paraguay, donde circulan los 4 serotipos, los DENV 1 y DENV 4 se aislaron más entre los 11 y 30 años de edad, DENV 2 y DENV 3 entre los 21 y 41 años, y no se observaron diferencias en los días de inicio de síntomas entre los serotipos, la mayoría de los cuales fue de 3 días o menos, solo para el DENV 1 se logró determinar un 59.17% de casos primarios y para el resto de los serotipos en su mayoría como casos secundarios, la sintomatología respiratoria fue asociada al DENV 4 (OR 1.26, IC 1.02-1.56) al igual que la cutánea (OR 2.34, IC 1.91-2.86), no así la gastrointestinal observada más en el DENV 3 (OR 1.25, IC 1.17-1.33) y las manifestaciones neurológicas al DENV 2 (OR 3.02, IC 1.06-8.58). **(23)**



JUSTIFICACIÓN

En México, y principalmente en el sur y sureste del país, el dengue continua siendo un problema de salud pública aún a pesar de los esfuerzos múltiples para el control del vector transmisor. Existe la evidencia de la co-circulación de los 4 serotipos de dengue en esta región con manifestaciones clínicas diversas. Con información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica sabemos de la predominancia del serotipo 1, sin embargo el espectro clínico actual es muy variado y no existe un estudio previo en nuestro país que correlacione la sintomatología clínica con el genotipo que afecta a los casos de dengue. El conocimiento de ello puede apuntalar el reconocimiento de manifestaciones asociadas por serotipo y genotipo para cada uno de los casos estudiados, pudiendo quizá hasta reconocerse un cambio de aquellos por la presentación clínica.



OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la correlación clínica de casos de dengue con los serotipos circulantes en un brote en la Costa de Chiapas

ESPECÍFICOS

- Describir los hallazgos de laboratorio y gabinete por fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue.
- Determinar la serotipificación de casos con sintomatología de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue.
- Correlacionar los datos clínicos, laboratorio y gabinete con los serotipos aislados.



MATERIAL Y MÉTODOS

Información de casos y tomas de muestras

Para dar respuesta a la pregunta de investigación, se propuso realizar un estudio observacional de tipo retrospectivo.

- Los casos incluidos fueron los notificados por el Hospital General de Zona No. 1 del IMSS y de la Clínica Hospital del ISSSTE de Tapachula y con muestras obtenidas del Sistema de Vigilancia rutinario de vigilancia epidemiológica.
 - Se recolectaron los datos clínicos del expediente, además de datos de laboratorio y gabinete de los casos sospechosos de dengue, desde su ingreso hospitalario hasta su egreso de los siguientes rubros:
 - Datos clínicos de dengue: para su clasificación se tomaron los criterios descritos en la NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.
 - Los datos clínicos se recolectaron siguiendo el orden del formato del CDC, dispuesto para pacientes hospitalizados por dengue.
 - Se recolectó la información de las biometrías hemáticas y químicas sanguíneas que incluyeron las pruebas de funcionamiento hepático y renal.
 - En los casos en los que se logró tener acceso, se recolectaron las descripciones de los estudios de gabinete, lo cual incluyó placas de rayos X y estudios ultrasonográficos.
 - Los días de estancia se tomaron directamente del cada expediente analizado.

Detección virológica

- Detección del ARN del Virus Dengue por RT-PCR obtenido de sueros rescatados.
 - Para determinar la presencia del virus dengue en sueros se empleó la técnica de RT-PCR, descrita por Lanciotti et al. (1992).

Extracción del ARN:

- Cada muestra serológica congelada a una temperatura de -20 GC se descongeló agregándose 100 µl de Trizol® (Invitrogen® No. Cat. 10296-010); posteriormente se le agregó 40 µl de cloroformo grado biotecnología 99.9+% (Sigma-Aldrich®), a cada tubo, y se mezcló



brevemente con ayuda de un Vortex (Scientific Industries modelo Vortex-2 Genie®), a velocidad media; a continuación se centrifugó a una velocidad de 12,800 rpm durante 8 min. A 4° C. (en la centrifuga refrigerada Hermle® modelo Z 233 MK-2); se trabajó con la fase superior del centrifugado, la cual fue transferida a viales nuevos y estériles, a los cuales se les agregó 100 µl de isopropanol absoluto grado biología molecular (Sigma®), y se dejó reposar 15 min. A -70° C.; posteriormente se centrifugó a una velocidad de 12,800 rpm durante 30 min. a 4° C.; pasado este tiempo se decantó el sobrenadante, y se lavó la pastilla con 100 µl de etanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich®) al 70% en volumen, mezclando suavemente; nuevamente se centrifugó a una velocidad de 12,800 rpm durante 5 min. a 4° C., y luego se decantó el sobrenadante; la pastilla se secó a 40° C. por 5 min.; y se re-suspendió en 5 µl de agua destilada libre de ADNAsas y ARNAsas grado biología molecular (Gibco®); posteriormente se colocó a baño maría a una temperatura de 62° C. por 10 min. y finalmente se enfrió en hielo por 5 min. El producto obtenido hasta el último paso se propuso fuera ARN procedente de las muestras serológicas, o del virus dengue en caso de estar infectado; este ARN obtenido se guardó a -70° C. hasta su utilización.

○ Transcripción Reversa (RT).

- El ARN viral, si estuvo presente en la muestra, obtenido en la extracción fue convertido a una copia de ADN o ADN complementario (cADN), por medio de la acción enzimática de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega® No. Cat. M1701) en presencia de los 4 desoxinucleotidos trifosfato (dNTP's): dATP, dGTP, dCTP y dTTP grado biología molecular (Fermentas No. Cat. R0181), y el oligonucleótido (cebador) reverso del virus dengue D2 (secuencia: 5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3') (Invitrogen®), homólogo al genoma de ARN de los cuatro serotipos. Previamente las muestras se transfirieron a viales de 0.2 ml libres de DNAsas y RNAsas (Eppendorf®), y se adicionaron 2 µl del oligonucleótido D2 10 pM y 5 µl de agua destilada grado biología molecular, y se calentaron a 70° C. por 5 min. en un Termociclador (Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 9600), pasado este tiempo los tubos se colocaron en hielo por 3 min. y se centrifugaron a velocidad baja por 30 segundos a 4° C; posteriormente se



agregaron 13 μl de la mezcla de reacción. Los reactivos presentes en la mezcla de reacción se describen en el cuadro siguiente. Posteriormente se colocaron en el Termociclador, en que se programaron las siguientes condiciones de reacción: 42° C/60 min., 70° C/5 min. y 4° C/ ∞ .

Reactivos	Cantidad por una muestra
M-MLV Buffer (Promega® No. Cat. M531A)	5.0 μl
DNTP's 2.5 mM (Fermentas No. Cat. R0181)	5.0 μl
RNAase Out (Invitrogen® No. Cat. 10777-019)	0.7 μl
M-MLV RT	1.0 μl
Agua destilada grado biología molecular	1.3 μl

- Electroforesis de los productos de PCR.
 - Al término de la amplificación del material genético del virus dengue por PCR, 10 μl de cada uno de los productos obtenidos se examinó por medio de electroforesis en geles de agarosa (Sigma®) al 1.5%, a los que se les aplicó una corriente eléctrica de 80 Volts. La visualización de las bandas de los productos amplificados se hizo a través de la tinción de los geles con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo BioDoc-it® Imagine System).
 - Para la determinación del peso molecular en los geles de agarosa se utilizó el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen No. Cat. 10787-018). Los 10 μl de muestra se mezclaron con 3 μl de solución amortiguadora de carga tipo III 6 X (azul de bromofenol 0.25%, xileno cyanol FF 0.25% y glicerol al 30% en agua), y posteriormente se depositó en los pozos formados en el gel por un peine de acrílico. Los controles positivos utilizados en este estudio se obtuvieron del laboratorio a cargo del Dr. Celso Ramos García, del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas / Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI/INSP), Cuernavaca, Morelos; estos controles



procedían de lisados celulares de los cuatro virus dengue cultivados en la línea celular C6/36. Se manejó un control negativo de agua destilada grado biología molecular.

- La presencia o ausencia del virus dengue en las muestras analizadas se pudo determinar con la presencia o ausencia de una banda en los geles de electroforesis. Se determinó que una muestra fue positiva a la infección por virus dengue cuando presentó por lo menos una banda en alguna de las cuatro reacciones realizada para cada uno de los serotipos, la cual debía coincidir con el respectivo peso molecular del producto esperado, además también esta banda debía coincidir con la banda del control positivo; esto ayudó a determinar si una muestra es positiva, y dependiendo de la presencia de la banda en uno o en varios geles se determinó el o los serotipos presentes.

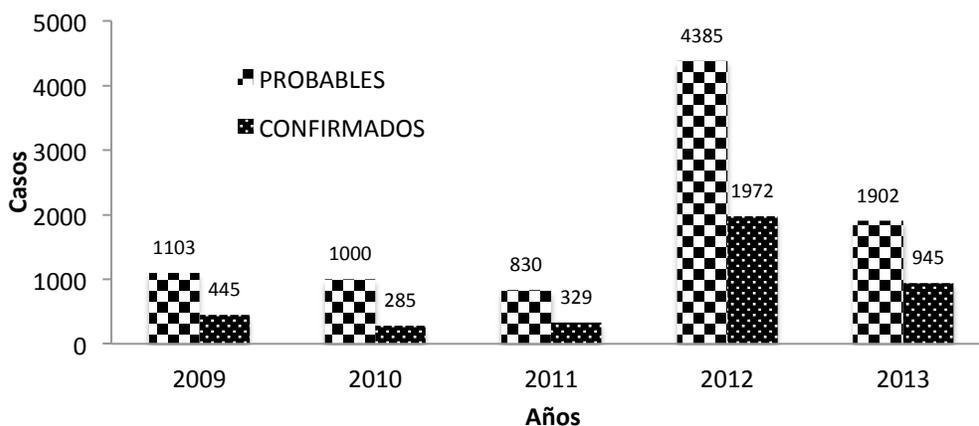


Análisis de resultados

Contexto general de los datos.-

En la Gráfica 1 se observan los casos documentados de dengue en la Jurisdicción Sanitaria (JS) 7 Tapachula, durante los últimos 5 años; notablemente durante 2012 se observó un aumento del 428.3% respecto al año anterior.

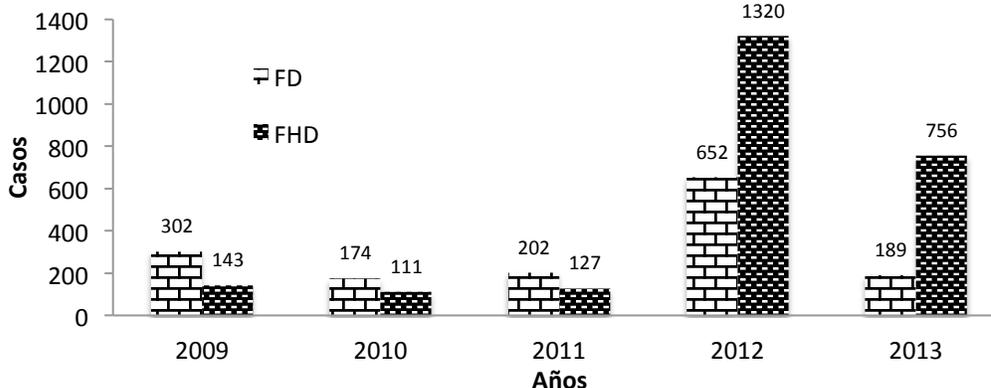
Gráfica 1. Casos de Dengue probables y confirmados, 2009 - 2013, JSVII Tapachula



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,

Durante 2012 se confirmaron por laboratorio el 44.97% de los 1,972 casos notificados (Gráfica 2), siendo la relación de casos de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue de 1:1.6 casos.

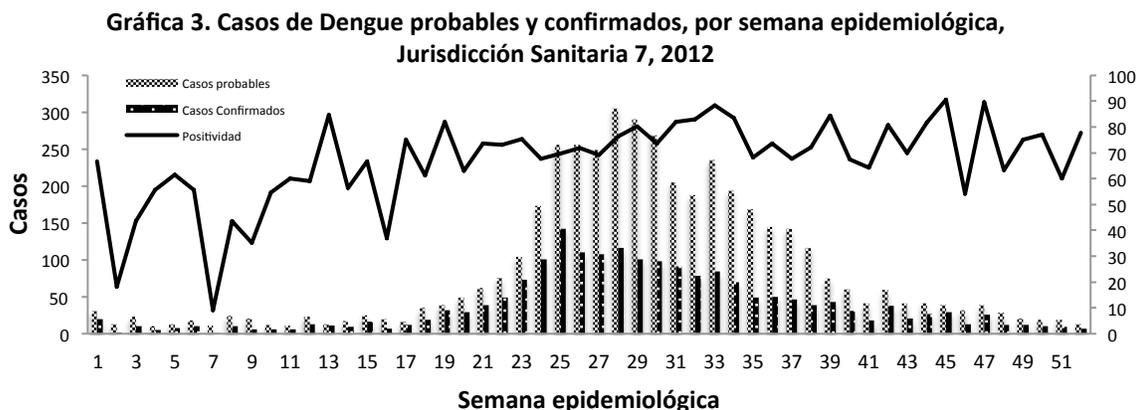
Gráfica 2. Casos confirmados de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue, 2009 - 2013, JSVII Tapachula



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,

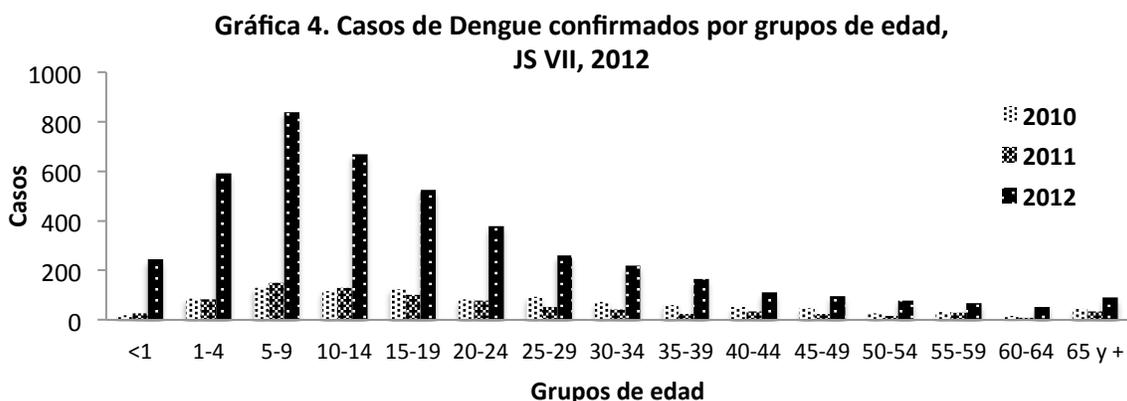


Por semana epidemiológica, el aumento de casos se observa a partir de la semana 18 (Gráfica 3), con una duración de la curva de casos probables de 30 semanas, sin embargo el índice de positividad (relación entre casos probables con muestra y número de muestras positivas se mantuvo en dos tercios del año, a pesar de la disminución del número de casos probables.



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,

Durante 2012, la curva por edad presentó una desviación a la izquierda con predominio de casos en los menores de 20 años (Gráfica 4), agrupando al 64% del total de casos, comparativamente con respecto a los dos años anteriores la distribución en este grupo etario fue en aumento desde 2010 con el 47.5% y en 2011 con el 58.7%.



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,



Al observar los casos por municipio, alrededor del 82% del total de casos presentados en los municipios de la costa correspondientes a la JS 7 (Cuadro 1), se concentraron en 5 de los 16 que presentaron, incluyendo 21 casos que no pertenecen a esta Jurisdicción; estos fueron Tapachula con el 46.8% del total de casos, seguido por Huixtla con el 17.2% de los casos, Villa Comaltitlán observó el 7.5%, muy cerca Tuzantán con el 6.3% y Huehuetán con el 4.6%, haciendo un total de 1,975 casos.

Cuadro 1. Casos de FD y FHD por municipio, JS 07, 2012

MUNICIPIO	FD	FDH	TOTAL DE CASOS	%	% ACUM
TAPACHULA	347	577	924	46.8	46.8
HUIXTLA	97	240	337	17.1	63.8
VILLA COMALTITLÁN	34	114	148	7.5	71.3
TUZANTÁN	27	98	125	6.3	77.7
HUEHUETÁN	21	69	90	4.6	82.2
MAZATÁN	29	46	75	3.8	86.0
ESCUINTLA	22	34	56	2.8	88.9
ACAPETAHUA	16	32	48	2.4	91.3
TUXTLA CHICO	10	27	37	1.9	93.2
CACAHOATÁN	12	18	30	1.5	94.7
SUCHIATE	10	18	28	1.4	96.1
MAPASTEPEC	10	13	23	1.2	97.3
OTROS	5	16	21	1.1	98.3
FRONTERA HIDALGO	8	6	14	0.7	99.0
ACACOYAGUA	2	8	10	0.5	99.5
UNIÓN JUÁREZ	2	3	5	0.3	99.8
METAPA DE DOMÍNGUEZ	1	3	4	0.2	100.0
TOTAL	653	1322	1975	100.0	

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,

A nivel estatal, la tasa de FHD fue de 141.13 casos por 100,000 habitantes, presentando casos por arriba de la tasa estatal Huixtla con 442.3 casos por 100,000 habitantes, al igual que Villa Comaltitlán, Tuzantán, Huehuetán, y Tapachula.

Cuadro 2. Tasa de FD y FHD por municipio, JS 07, 2012

MUNICIPIO	TASA FD	TASA FHD
HUIXTLA	178.75	442.27
VILLA COMALTITLÁN	108.24	362.93
TUZANTÁN	91.97	333.81
HUEHUETÁN	55.35	181.87



TAPACHULA	107.91	179.44
MAZATÁN	97.04	153.93
CHIAPAS	69.97	141.13
ACAPETAHUA	54.76	109.51
ESCUINTLA	66.78	103.21
TUXTLA CHICO	25.33	68.38
SUCHIATE	27.56	49.6
METAPA DE DOMÍNGUEZ	16.46	49.39
FRONTERA HIDALGO	63.23	47.42
ACACOYAGUA	11.09	44.37
CACAOATÁN	26.78	40.17
MAPASTEPEC	22.81	29.66
UNIÓN JUÁREZ	11.73	17.59

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Dengue, SINAVE, SSA, 2009-2014,

Por serotipo, los aislamientos en la costa han sido predominantemente del serotipo 1 de 2009 a 2012, observándose en éste último año una proporción del 57.9%.

Cuadro 3. Serotipos de Denguevirus por año, JS 07, 2009-2013

DATO	2009	2010	2011	2012	2013
AISLAMIENTOS POSITIVOS A DENV-1	0	2	43	253	23
AISLAMIENTOS POSITIVOS A DENV-2	8	19	10	184	99
AISLAMIENTOS POSITIVOS A DENV-3	0	0	0	6	4
AISLAMIENTOS POSITIVOS A DENV-4	0	5	7	7	1

Descripción de la población en estudio.

Para el presente estudio se logró obtener un total de 51 muestras serológicas, de las cuales una pertenecía a una persona residente del Estado de México y en otra no se logró obtener el expediente clínico, por lo que fueron descartadas debido a la falta de la fuente primaria para la validación de datos clínicos. En total se incluyeron 49 muestras (Cuadro 4), de las cuales 33 (67.3%) fueron de residentes del municipio de Tapachula y 5 (10.2%) de Huixtla, junto al resto de casos como se describe a continuación:

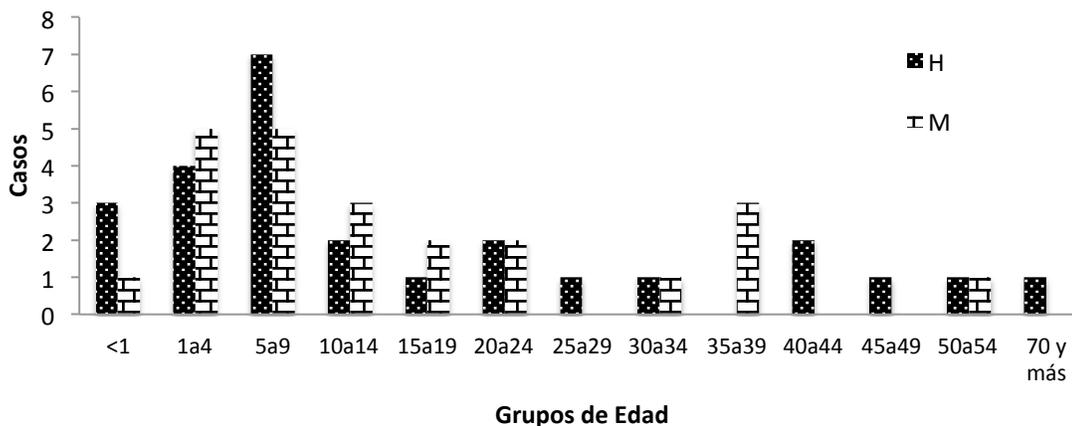


Cuadro 4. Casos de dengue por serotipo y municipio, 2012.

MUNICIPIO	SEROTIPO			Total	%
	1	2	SD		
TAPACHULA	22	9	2	33	67.3
HUIXTLA	4	1	0	5	10.2
VILLA COMALTILÁN	2	1	0	3	6.1
CACAOATÁN	2	0	0	2	4.1
HUEHUETÁN	2	0	0	2	4.1
TUZANTÁN	2	0	0	2	4.1
FRONTERA	1	0	0	1	2.0
MAZATÁN	1	0	0	1	2.0
Total	36	11	2	49	100.0

Por grupo de edad, la distribución de la mayoría de los casos estudiados es similar a lo reportado en los 16 municipios de la JS 7 descritos anteriormente, con excepción de los casos de 35 a 44 años (Gráfica 5), se observa una distribución similar por género, agrupando el masculino 26 (53.1%) de los casos; se observa que 34 (69.4%) de los casos corresponden a personas de 20 años y menos.

Gráfica 5. Casos de Dengue por Grupo de Edad



En dos casos no fue posible documentar el serotipo viral.

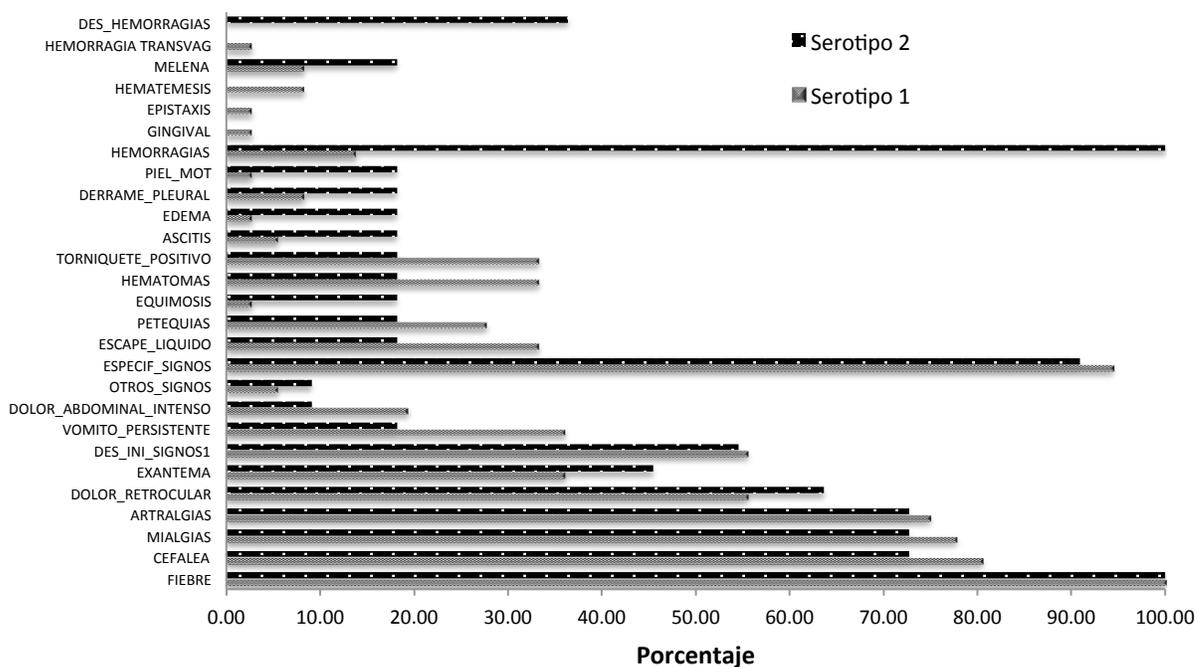


Cuadro 5. Síntomas predominantes por serotipo

SIGNOS Y SÍNTOMAS	SEROTIPO		SIGNOS Y SÍNTOMAS	SEROTIPO	
	2	%		1	%
FIEBRE	11	100.0	FIEBRE	35	97.2
OTR_ESC_LIQUIDO	11	100.0	OTR_ESC_LIQUIDO	34	94.4
HOSPITALIZADO	10	90.9	HOSPITALIZADO	32	88.9
CEFALEA	8	72.7	CEFALEA	28	77.8
MIALGIAS	8	72.7	MIALGIAS	27	75.0
ARTRALGIAS	8	72.7	ARTRALGIAS	26	72.2
DOLOR_RETROCLAR	7	63.6	DOLOR_RETROCLAR	19	52.8
EXANTEMA	5	45.5	EXANTEMA	12	33.3
HEMATEMESIS	5	45.5	HEMATOMAS	12	33.3
MELENA	5	45.5	TORNIQUETE_POSITIVO	12	33.3
HEMATOMAS	4	36.4	VÓMITO_PERSISTENTE	12	33.3
TORNIQUETE_POSITIVO	4	36.4	ESCAPE_LÍQUIDO	12	33.3
PETEQUIAS	3	27.3	PETEQUIAS	10	27.8

La sintomatología por serotipo es similar en más del 50 % de los casos para ambos (Cuadro 5), observándose en el serotipo 2 mayor frecuencia de sintomatología hemorrágica, mientras que más datos de escape de líquido en el serotipo 1.

Gráfica 6. Signos y Síntomas por serotipo





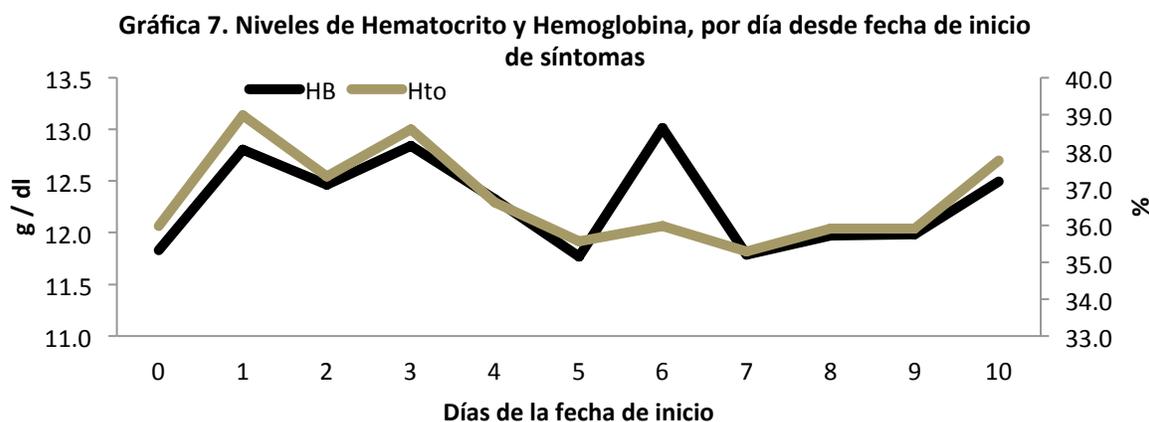
Descripción de los estudios de gabinete

Para la descripción de los niveles de plaquetas y el hematocrito, los casos se agruparon en 3 grupos a través de percentiles y por diagnóstico clínico inicial (Cuadro 6), de estos, 28 (57.1%) fueron Fiebre Hemorrágica por Dengue.

Cuadro 6. Niveles de Hematocrito y Plaquetas por fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue

NIVELES DE HEMATOCRITO				NIVELES DE PLAQUETAS			
PERCENTIL	RANGO	FHD	FD	PERCENTIL	RANGO	FHD	FD
1	19.0 - 34.9	8	5	1	17,000 - 49,000	11	1
2	35.0 - 37.2	5	7	2	50,000 - 100,000	10	1
3	37.3 - 48.9	15	9	3	101,000 - 283,000	7	19
Total		28	21	Total		28	21

Para la cuantificación de plaquetas se consideró el valor más bajo registrado en el expediente y/o en el formato de laboratorio (Cuadro 7), se observó de forma más importante en el serotipo 1, con un 33.34% del total de conteos con valores menores de 50,000 plaquetas por microlitro, y el 63.9% con conteos menores a 100,000.



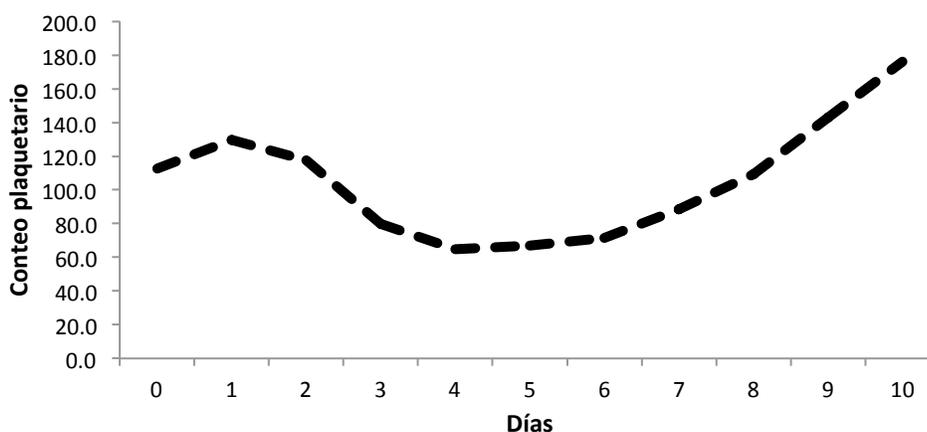
En el seguimiento de los niveles de hematocrito y hemoglobina por día se observa un comportamiento muy similar al del desarrollo de la enfermedad (Gráfica 7), con excepción del séptimo día, en el cual se observa un aumento en del nivel de hemoglobina con respecto al porcentaje de hematocrito (promedio de los valores absolutos).



Cuadro 7. Plaquetopenia por serotipo.

CATEG_PLAQ	SEROTIPO			Total
	SD	1	2	
17,000 - 49,000	0	12	3	15
50,000 - 100,000	0	11	1	12
101,000 - 283,000	2	13	7	22
Total	2	36	11	49

Gráfica 8. Promedio de Conteo plaqueta desde fecha de inicio de síntomas



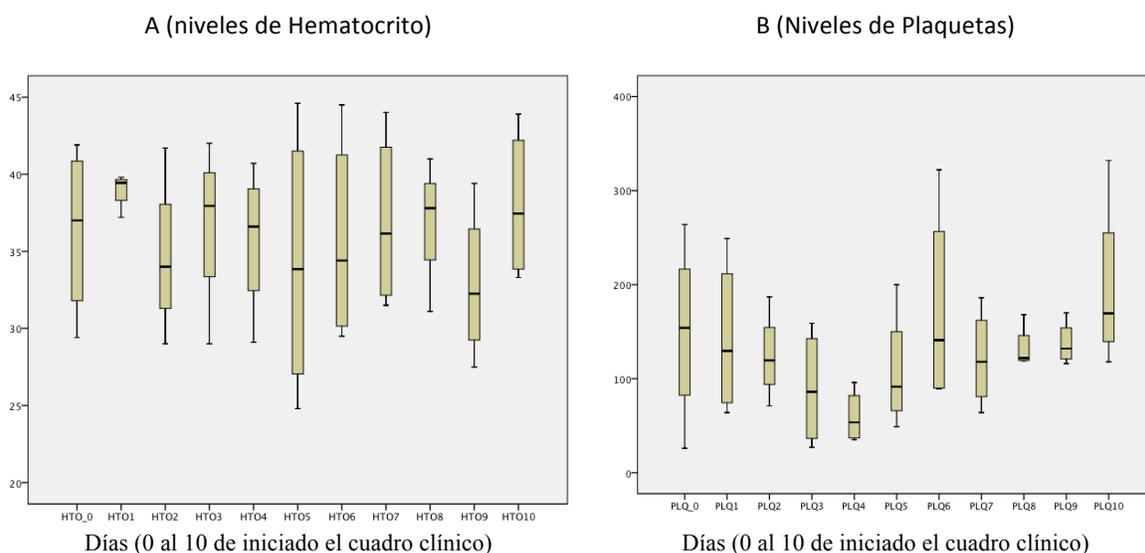
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mín.	26.00	64.00	42.00	17.00	13.00	12.00	12.00	14.00	41.00	114.00	118.00
Máx.	264.00	249.00	188.00	283.00	239.00	352.00	322.00	335.00	266.00	185.00	332.00

Al graficar el promedio del conteo plaquetario (Gráfica 8) se observa la mayor disminución entre el 5º y 7º día, con recuperación posterior al décimo día en la mayoría de los casos con valores extremos mínimos de 12 a 17 mil plaquetas entre los días 3º y 7º de iniciado el cuadro febril.

Los niveles de hematocrito son variables al inicio, con un mayor rango de valores al 5º día de iniciado el cuadro, y de plaquetas en el 6º. Día (Gráfica 9).



Gráfica 9. Niveles de hematocrito y plaquetas por día de toma, según fecha de inicio de síntomas



Gráfica 8. Niveles de Hematocrito y Hemoglobina, por día desde fecha de inicio de síntomas



Comparando el comportamiento de los niveles de hematocrito y hemoglobina (Gráfica 8), se observa que en ambos, los valores más bajos fueron alcanzados entre el 4º y 7º día de iniciado el cuadro, la línea roja representa el nivel mínimo normal, inferior a la cual son valores considerados plaquetopenia.

Ajustando por la oportunidad del día de la toma de muestra, observamos una relación del nivel de plaquetopenia en el percentil 1 (rango de 17,000 a 49,000) con un incremento del riesgo de 134.25 veces, para la clasificación clínica de fiebre hemorrágica por dengue. En el nivel de plaquetopenia perteneciente al percentil 2 (50,000 a 100,000) el riesgo fue de 49.29 veces más: en ambos casos se muestran intervalos de confianza altos no significativos, probablemente debido al tamaño de la muestra analizada.



Cuadro 8.

PERCENTIL	RANGO	Clasificación Clínica: FHD*
		RR
1	17,000 - 49,000	134.25 (10.30 - 1749.6)
2	50,000 - 100,000	49.29 (4.04 - 600.8)

* Ajustando por días de demora en la toma de muestra, con rango de 2 a 11 días)

Incluyendo el serotipo 1 en el análisis el riesgo, se incrementó en la categoría del percentil 1 a 188.52 (rango de 10.53 – 3374.7) y para el percentil 2 el incremento es a 88.97 veces el riesgo (rango de 4.32 - 1553.5).

Se observó que en el percentil 2 el riesgo para el serotipo 1 se incrementó 21.94 (rango de 0.91 – 524) veces más en comparación con el percentil 1 que presentó un riesgo de 5.84 (rango de 0.30 – 112.28). En ambos casos los valores no son significativos, siendo necesario incrementar el tamaño de la muestra.

PERCENTIL	RANGO	Clasificación Clínica: FHD*	Serotipo 1*
		RR	RR
1	17,000 - 49,000	188.52 (10.53 - 3374.7)	5.84 (0.30 - 112.28)
2	50,000 - 100,000	88.97 (4.32 1553.5)	21.94 (0.91 - 524)

* Ajustando por días de demora en la toma de muestra, con rango de 2 a 11 días)

Del total de casos los hallazgos de USG se limitan a los realizados a 5 (10%) de los casos, por serotipo los hallazgos son los siguientes:

Serotipo 1:

- Reporte de normalidad en el estudio hasta:
 - Colecistitis alitiásica
 - Líquido libre en cavidad
 - Serositis

Serotipo 2:

- Líquido libre en cavidad

No se documentó la realización de estudios radiológicos en los expedientes revisados.



Discusión

Trabajos previos han demostrado que con una detección temprana puede mejorar la sobrevida de los casos principalmente de fiebre hemorrágica por dengue (24) y la identificación de signos y síntomas puede proporcionar datos predictivos de su presentación clínica y de las posibles complicaciones; con pruebas de laboratorio que combinadas con las características clínicas nos proveen información adicional valorable proporcionándonos modelos previos a información adicional de serotipificación.

El seguimiento hematológico y de los niveles plaquetarios son en la actualidad parte central para la clasificación clínica, el seguimiento y la clasificación final (25), sin embargo de manera ordinaria no son tomados con oportunidad con muestras en su mayoría fuera de oportunidad diagnóstica para aislamiento y serotipificación, la cual es de suma relevancia cuando se ha demostrado la co-circulación de los 4 serotipos principales en la entidad y en la región. Hemos abordado el problema de la caracterización clínica mediante la recolección de datos de inicio por el sistema habitual de vigilancia epidemiológica, el cual puede ser considerado como pasivo; con la validación y complementación posterior con los datos obtenidos de los expedientes disponibles de casos en los que se logró obtener muestras de forma oportuna para lograr la serotipificación viral.

Los sueros incluidos en el presente estudio provienen de los casos notificados de dengue en esta zona geográfica del estado con una distribución proporcional similar mayoritariamente de edades menores a 20 años y de lugares de residencia con las tasas más altas a nivel local, aun cuando se ha demostrado previamente la co-circulación de los 4 serotipos a nivel estatal, en esta muestra solo fue posible aislar los serotipos 1 y 2. Estudios previos han demostrado la presencia de alteraciones hepáticas dependientes del serotipo (23) lo cual no fue posible en este trabajo por la falta de información en los expedientes revisados, sin embargo sí se documentó escape de líquido a tercer espacio como hallazgo complementario en estudios de gabinete (ultrasonografía), aunque en un número mucho menor al deseable. La sintomatología por serotipo muestra diferencias sin lograr comprobarse estadísticamente, lo que probablemente se deba al tamaño de la muestra, sin embargo se logró demostrar que existe mayor riesgo de que pacientes con el serotipo 1 y plaquetopenia ajustada al día de la toma de muestra dependiente del inicio del cuadro clínico, sean clasificados como casos de fiebre hemorrágica por dengue.

La mayor disminución del conteo plaquetario se observó en promedio entre los días 3 al 7 de iniciado el cuadro clínico lo cual concuerda con lo sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), durante este periodo se presenta la mayoría de las complicaciones. Es muy similar la sintomatología inicial para los dos serotipos, sin embargo en los signos clínicos encontramos una proporción mayor de datos de escape de líquido para casos con



serotipo 2 y datos clínicos hemorrágicos preferentemente en el grupo con serotipo 1; en ambos casos con proporciones menores al 30% de los casos incluidos, haciendo deseable una mayor vigilancia virológica, toda vez que se observa el aislamiento sólo en el 22.8% de los casos de acuerdo a la plataforma del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), de la cual se toma la información para las actividades de prevención y control del vector.

Existe una divergencia entre el hematocrito y los conteos plaquetarios con disminución de estos últimos el 7º día, lo cual difiere de lo reportado por la OMS, la cual señala que esta divergencia es esperada entre el 3º y 6º día, esperando la aparición de complicaciones en ese periodo.



Conclusiones

La población de la cual preceden los casos estudiados, si bien tiene una distribución por edad y por lugar de residencia habitual similar al total de casos notificados en el mismo periodo de estudio en los municipios que comprenden la Jurisdicción Sanitaria 7 de Chiapas, no permitió alcanzar el poder estadístico necesario para demostrar diferencias clínicas por serotipo, sin embargo se logró corroborar lo descrito en otras publicaciones, con un tiempo acortado al periodo de plaquetopenia reportado en un día menos, siendo esto relevante al momento de decidir el tiempo de observación hospitalaria o ambulatoria.

Los signos relativos al escape de líquidos fueron mayores en los casos con DENV1, mientras que las hemorragias a todos los niveles fueron mayoritariamente observadas en DENV2, con leve divergencia entre el hematocrito y el nivel de plaquetopenia reportado en otros trabajos, los datos clínicos iniciales son similares proporcionalmente para ambos serotipos encontrados.

La ampliación y diferenciación del espectro clínico es deseable al igual que la replicación con un mayor número de casos a incluir y que permitan una representación estadística más cercana a la población fuente. El Sistema de Vigilancia no se cuenta con la información necesaria para la certeza diagnóstica de la totalidad de los casos notificados, lo cual es deseable si se quiere escalar a un mayor conocimiento de los serotipos circulantes, una caracterización mayor y el desarrollo de nuevas estrategias poblacionales, biológicas y moleculares para la prevención y control de esta enfermedad.



Perspectiva de investigación

Se requiere mayor cobertura en la vigilancia virológica, la cual en la zona en el periodo de estudio fue menor al 23% del total de las muestras. Dada la comprobada co-circulación viral en la entidad, es necesario conocer los genotipos circulantes debido al espectro clínico en que se presentan, ello proporcionaría un conocimiento del origen del virus, lo cual posee múltiples implicaciones para el manejo del dengue, incluso para el desarrollo de vacunas.

Se hace necesaria la validación sistemática de la información a partir de la cual se toman las decisiones en políticas de control de vectores, toda vez que el conocimiento de la distribución de casos continúa por delante de la distribución entomológica.

El registro sistemático de información clínica adicional continúa siendo el mismo desde que existe el Sistema de Vigilancia Epidemiológica actual, sin haberse observado la evolución clínica cambiante, lo que limita la comparación con datos entre un año y otro aún cuando se tiene la evidencia de circulación de serotipos dominantes, así como la posibilidad de registro de nuevos datos clínicos que en la actualidad no se consideran, es además necesaria la recolección adicional de datos de las comorbilidades que tan ampliamente se distribuyen en nuestra población, toda vez que esas enfermedades pueden modificar los cuadros de presentación del dengue y ser factores predictores de la evolución de la enfermedad.



BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Science Insider News, from Science Magazine:
<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>
2. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. Dengue y Dengue Hemorrágico. Nota descriptiva No. 117 (actualizado en Enero, 2012), acceso el 03 de septiembre de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
3. Narro-Robles, J, Gómez-Dantés H. El dengue en México: un problema prioritario de Salud Pública Salud Pública Méx 1995; Vol. 37 (sup 1):12-20.
4. Colón-González FJ, Lake LR, and Bentham G. Climate Variability and Dengue Fever in Warm and Humid Mexico. Am J Trop Med Hyg 2011 84:757-763; doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0609.
5. Hurtado-Díaz M., Riojas-Rodríguez H., Rothenberg S. J., Gomez-Dantés, H. and Cifuentes, E. (2007), Short communication: Impact of climate variability on the incidence of dengue in Mexico. Tropical Medicine & International Health, 12: 1327–1337. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01930
6. Vázquez-Pichardo M, *et al.* Serotipos de dengue en México durante 2009 y 2010. Bol Med Hosp Infant Mex 2011;68(2):103-110. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2011/hi112e.pdf>
7. Escobar-Mesa J y Gomez-Dantes H,. Determinantes de la transmisión de dengue en Veracruz: un abordaje ecológico para su control. Salud Pública Méx [online]. 2003, vol.45, n.1 [citado 2012-09-19], pp. 43-53 . Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-363420030001000006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0036-3634
8. Espinoza-Gomez F, *et al.* Transmisión interepidémica del dengue en la ciudad de Colima, México. Salud pública Méx [online]. 2003, vol.45, n.5 [citado 2012-09-19], pp. 365-370 . Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-363420030005000006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0036-3634.
9. Navarrete-Espinoza J, *et al.* Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. Salud pública Méx [online]. 2006, vol.48, n.3, pp. 220-228. ISSN 0036-3634.
10. Byron E. E. Martina,* Penélope Koraka, and Albert D. M. E. Osterhaus. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. Clin Microbiol Rev. 2009 October; 22(4): 564–581. doi: 10.1128/CMR.00035-09
11. Sansanee Noisakran and Guey Chuen Perng. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection Experimental Biology and Medicine April 2008 233:401—408; doi:10.3181/0707-MR-198
12. Tuiskunen A, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. Arch Virol. 2011 Nov; 156(11):2023-32. Epub 2011 Sep 16.
13. Tuiskunen A, *et al.* Phenotypic characterization of patient dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. Virol J. 2011 Aug 11; 8:398. doi: 10.1186/1743-422X-8-398.



14. Leitmeyer KC. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 1999, 73(6):4738--4747
15. Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, Weaver SC. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*. 2007 Feb 20;358(2):402-12. Epub 2006 Oct 2.
16. Falcon-Lezama J; Sanchez-Burgos, GG y Ramos-Castaneda J. Genética de las poblaciones virales y transmisión del dengue. *Salud pública Méx* [online]. 2009, vol.51, suppl.3, pp. s403-s409. ISSN 0036-3634.
17. Hammond S.N. et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 73(6), 2005, pp. 1063-1070.
18. Guilarde A.O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: Clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis*. 2008 Mar 15;197(6):817-24.
19. Rai S, et al. Clinico-laboratory findings of patients during dengue outbreak from a tertiary care hospital in Delhi. *Trop Doct*. 2008 Jul; 38(3): 175-177.
20. Tsai J.J. et al. Effect of serotype on clinical manifestations of dengue fever in adults. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009 Dec; 42(6): 471-478.
21. Suwandono A, et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100(9): 855-862. Epub 2006 Feb 28.
22. Balsemeda A, et al. Serotype-Specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 74(3), 2006, pp: 449-456.
23. Halser E.S. et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *Plos Negl Trop Dis* 6(5).
24. José G. Rigau-Pérez Jj.G and The Puerto Rico Association of Epidemiologists. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990–1991. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 1(5), 1997.
25. Secretaría de Salud. NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, *Diario Oficial de la Federación*, México, 2010.