

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CAMPECHE**

**COMPORTAMIENTO DEL DENGUE EN EL ESTADO DE CAMPECHE EN UN
PERIODO DE DIECISEIS AÑOS (1990 – 2005)**

**Tesis presentada en opción al
Grado de Doctora en Ciencias Médicas**

Autor: Dra. Tayde Josefina Sosa Cabrera

Tutoras

Profesora María G. Guzmán Tirado, DrCs

Profesora Susana Vázquez Ramudo, Dr C

La Habana

2009

SÍNTESIS

Se reportaron los datos clínicos epidemiológicos de los casos de Fiebre por dengue (FD) y de Fiebre hemorrágica por dengue (FHD) confirmados y notificados por el sector salud en el estado de Campeche de 1990-2005. Se describe la transmisión de la enfermedad en ausencia aparente de un brote epidémico en escolares asintomáticos en el año de 1994. Se desarrolló durante dos años (1999-2000) una vigilancia serológica de febriles en el municipio de Campeche (el más poblado del estado) con el objeto de realizar una detección temprana de la transmisión del dengue. Se analizaron las características clínicas y epidemiológicas de un brote de dengue en el año de 1997 en un área rural del estado; así como la prevalencia de anticuerpos y la detección de los serotipos de virus dengue que han circulado en los once municipios que conforman el estado de Campeche. La aplicación de las técnicas Inmunoenzimáticas ELISA y la de Neutralización permitió detectar una infección reciente o actual, la prevalencia de anticuerpos a virus dengue en la población y la alarmante circulación de los cuatro serotipos en todo el estado. Este trabajo permitió obtener información sobre cuales fueron las condiciones que precedieron a la aparición de una epidemia, en la que se presentaron casos con manifestaciones severas de la enfermedad (FHD/SCD). Se concluyó que en gran parte de las zonas infectadas por el vector pueden existir focos de transmisión endémica del dengue, que sirven de reservorio para posteriores epidemias, por lo que se recomienda que todo sistema de vigilancia epidemiológica en estas zonas debería incluir seguimiento de cohorte con el fin de estimar su incidencia real y que los centros de atención médica estén siempre alertas, ante la referencia de cuadro clínico sugestivo de dengue por parte de las personas de la comunidad como un posible indicador temprano de transmisión interepidémica. Estos resultados podrán ser comparados con lo que ocurre en otras regiones endémicas de México.

INDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

| | |
|-------------------------|---|
| I.1. Introducción | 1 |
| I.2. Hipótesis | 3 |
| I.3. Objetivos | 3 |
| I.4. Novedad científica | 4 |
| I.5. Valor teórico | 4 |
| I.6. Valor práctico | 5 |

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| II.1 Definición de Dengue | 6 |
| II.2. Antecedentes históricos | 6 |
| II.2.1. Dengue en las Américas. | 8 |
| II.2.2. Dengue en México. | 10 |
| II.2.3. Ubicación Geográfica del Estado de Campeche. | 13 |
| II.2.4. Dengue en Campeche. | 14 |
| II.3. Vector | 15 |
| II.4. Virus | 18 |
| II.4.1. Características del virus | 18 |
| II.5. Patogenia | 21 |
| II.6. Epidemiología | 25 |
| II.7. Cuadro Clínico | 28 |
| II.7.1. Fiebre por Dengue (FD) | 28 |
| II.7.2. Fiebre Indiferenciada | 29 |
| II.7.3. Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) | 29 |
| II.7.4. Definición de Síndrome de Choque por Dengue (SCD) | 31 |
| II.8. Diagnóstico | 32 |
| II.7.1. Fiebre por Dengue (FD) | 28 |
| II.8.1. Aislamiento del virus | 32 |
| II.8.2. Diagnóstico Serológico | 33 |

| | |
|--|----|
| II.9. Tratamiento | 35 |
| II.10. Prevención y control | 36 |
| CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| III.1 Incidencia de casos de dengue en el Estado de Campeche, México, de 1990-2005. | 38 |
| III.1.1. Tipo de Estudio. | 38 |
| III.1.2. Recopilación de información. | 38 |
| III.1.3. Incidencia de casos (confirmados) de fiebre de dengue. | 38 |
| III.1.4. Incidencia de casos de Fiebre Hemorrágica de dengue. | 39 |
| III.2. Estudio seroepidemiológico de virus dengue en escolares de la Ciudad de Campeche, en el año de 1994. | 40 |
| III.2.1. Tipo de estudio. | 40 |
| III.2.2. Universo de estudio. | 40 |
| III.2.3. Encuesta. | 40 |
| III.2.4. Obtención de muestras. | 43 |
| III.2.5. ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM a dengue (MAC-ELISA). | 43 |
| III.2.6. Inhibición de la Hemaglutinación (IH). | 44 |
| III.3. Estudio de un brote de dengue en un área rural del Estado de Campeche en el año 1997. | 46 |
| III.3.1. Área del estudio | 46 |
| III.3.2. Muestreo y recolección de datos | 47 |
| III.3.3. Toma de muestra | 48 |
| III.3.4. ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) | 48 |
| III.3.5. Neutralización | 48 |
| III.3.6. Cepas Virales | 48 |
| III.4. Estudiar la transmisión de virus dengue en febriles de etiología no precisada en el Municipio de Campeche durante los años 1999 y 2000. | 50 |
| III.4.1. Ubicación. | 50 |
| III.4.2. Universo de estudio. | 51 |
| III.4.3. Obtención de la muestra. | 51 |

| | |
|--|----|
| III.4.4. Determinación de IgM Dengue por MAC-ELISA | 53 |
| III.4.5. Visitas Domiciliarias | 53 |
| III.4.6. ELISA de Inhibición. | 53 |
| III.5. Conocer la seroprevalencia a los virus dengue en el Estado de Campeche | 54 |
| III.5.1. Tipo de estudio | 54 |
| III.5.2. Muestreo | 54 |
| III.5.3. Toma de muestra de sangre entera absorbida en papel filtro | 55 |
| III.5.4. ELISA de inhibición | 57 |
| III.5.5. Neutralización | 57 |
| III.5.6. Métodos estadísticos empleados para el análisis de resultados | 57 |
| | |
| CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| IV.2. Estudio seroepidemiológico a virus dengue en escolares de la Ciudad de Campeche en el año 1994. | 68 |
| IV.3. Estudio de un brote de dengue en un área rural del Estado de Campeche. | 72 |
| IV.4. Estudiar la transmisión a virus dengue en febriles de etiología no precisada en el municipio de Campeche durante los años 1999–2000. | 77 |
| IV.5. Conocer la seroprevalencia a los virus dengue en el Estado de Campeche, en el 2002 | 80 |
| | |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES | 88 |
| | |
| CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES | 90 |
| | |
| CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 91 |

Abreviaturas Empleadas en el Texto

| | |
|-------------------------------|---|
| AF | Anticuerpos Fluorescentes |
| ARN | Acido Ribonucleico |
| ADE | Inmunoamplificación |
| CIET | Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales |
| DEN-1 | Dengue 1 |
| DEN-2 | Dengue 2 |
| DEN-3 | Dengue 3 |
| DEN-4 | Dengue 4 |
| DGV | Dextrosa Gelatina Veronal |
| DO | Densidad Óptica |
| ECP | Efecto Citopático |
| ELISA | Análisis Inmunoabsorbente Unido a Enzima |
| FD | Fiebre del Dengue |
| FHD | Fiebre Hemorrágica del Dengue |
| FC | Fijación de Complemento |
| HLA | Antígenos de Histocompatibilidad |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogeno |
| ISET | Instituto de Salubridad en Enfermedades Tropicales |
| IH | Inhibición de la Hemaglutinación |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| INDRE | Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica |
| IFI | Inmnofluorescencia Indirecta |
| I MSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| Kb | Kilobases |
| MAC-ELISA | Elisa de Captura Para la Detección de Anticuerpos IgM a Dengue |
| MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| MEI | Elisa de Inhibición para Detección de Anticuerpos IgM |
| NT | Neutralización |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPD | Ortofenilendiamina |
| PAHO | Organización Panamericana de la Salud |
| PBS | Buffer Salina-Fosfatos |
| pH | Potencial de Hidrogeno |
| RT-PCR | Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| SINAVE | Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica |
| SSA | Secretaria de Salubridad y Asistencia |
| SCD | Síndrome de Choque por Dengue |
| SAB | Albúmina Sérica Bovina |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| TNF | Factor de Necrosis Tumoral |
| WHO | Organización Mundial de la Salud |

Capítulo I. Introducción

I.1 Introducción

El dengue es una enfermedad infecciosa emergente, que ha ido cobrando relevancia y que se puede convertir a corto y mediano plazo en una urgencia epidemiológica cuya magnitud rebasa la capacidad de respuesta de los servicios médicos asistenciales, subraye las limitaciones de las estrategias de control emergentes y resulte en un incremento en la mortalidad, principalmente en los niños

La Fiebre del Dengue (FD) y sus formas severas, la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) y el Síndrome del Choque por Dengue (SCD) son causadas por los virus del complejo dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (Huang et al., 1999; Leitmeyer et al., 1999; Shu et al., 2004) que se transmiten al hombre por la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes* infectado. Por lo general, el dengue es benigno, de curso autolimitado y temporalmente incapacitante. Se manifiesta de manera e intensidad variables en relación con los factores del huésped y determinadas características de la cepa viral.

Con el mosquito vector, el dengue se encuentra diseminado por las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Los anticuerpos contra los virus del dengue han sido detectados en el suero de individuos procedentes de las áreas tropicales de África, en las zonas templadas de Norteamérica y la región mediterránea, en la India, Sri Lanka, en el sureste asiático y en un gran número de islas en el Pacífico Occidental (Koraka et al., 2001). En el Continente Americano, se ha detectado en el Caribe, Centro y Sur América, México, y de manera muy esporádica en Estados Unidos.

Se calcula que alrededor de 2.5 billones de individuos viven en zonas de riesgo de transmisión de dengue, y al año se reportan en el mundo aproximadamente 100 millones de infecciones por dengue, 500 000 casos de FHD, 15 000 defunciones y cerca de 1.5 millones de niños hospitalizados por sus complicaciones (Gubler 1998; Guzmán y Kourí,2002). Aunque la FHD ha estado casi exclusivamente limitada a la región del sureste asiático, la historia y la evolución del dengue en las Américas y el Caribe muestra un patrón de comportamiento similar al que se presentó en el Sureste Asiático hace 40 años. El hemisferio americano enfrenta ahora la posibilidad de un alarmante panorama de epidemias de FHD que se disemina de un país a otro, cuyo primer indicador de alarma fue documentado en Cuba en 1981, cuando se reportó la primera

epidemia de FHD en el hemisferio americano y en la que se notificaron 344 203 casos de FD, 10 312 de FHD y 158 defunciones (Kourí et al., 1989; WHO 1998a) En el año 2000, 27 Países del Centro, Sur América y el Caribe reportaron transmisión de dengue, de estos, 17 notificaron casos de FHD y 10 países registraron muertes por FHD; siendo los más afectados Brasil, Ecuador, Colombia, Paraguay y Venezuela (Torres J, Torres JR, Torres CG.,2002).

En México, poco después de finalizada la campaña de erradicación de la fiebre amarilla y la eliminación de su vector *Aedes aegypti* en 1963, las autoridades sanitarias declararon que el país estaba libre de este vector. Sin embargo, tan sólo cuatro años más tarde se detectó nuevamente. A finales de los 70 ocurrió el primer brote registrado de FD causado por el serotipo 1 en el estado de Chiapas, a partir de ese momento, este virus se diseminó rápidamente por el territorio nacional. En 1983 el serotipo 2 fue reportado, siendo el responsable del mayor número de casos de FD en la región del Pacífico (Gómez et al.,1988). En 1984 el serotipo 4 fue declarado como el responsable de un brote en Yucatán, donde fueron detectados los primeros casos de FHD en el país (Gómez y Rodríguez,2000). En 1995 fue aislado por primera vez el serotipo 3 (Briseño et al.,1996), ocasionando severas epidemias en el año 1997; sin embargo, se observa una ligera tendencia a la disminución en el número de casos de dengue registrados en los últimos años con un aumento de los casos de dengue hemorrágico (SINAVE, 2006). La situación en México no es muy alentadora, ya que los esfuerzos para controlar las epidemias, podrían verse afectados por las condiciones socioeconómicas de la población y a la alteración de la ecología debida a una desmedida urbanización no planificada, factores que pueden favorecer el desarrollo del vector y la diseminación de los virus del dengue.

El estado de Campeche reportó los primeros casos de FD en 1980 y a partir de 1995 se detectó la presencia de FHD con la introducción del serotipo 3. En el año 1997 se presentó la mayor epidemia de FD/FHD que ha tenido el estado, con un total de 4927 casos (SSA 2000). Existen subregistros de los casos de dengue en el estado de Campeche durante la década de los 90, porque los médicos no reportaban los casos a las autoridades del sector salud y por carecer de un laboratorio de diagnóstico especializado, por lo que se desconoce la situación real del dengue en el estado. El panorama del dengue en Campeche es incierto por lo que en este trabajo nos propusimos conocer y analizar la trascendencia de un problema de salud regional.

I.2. Hipótesis:

¿Es el dengue un problema de salud emergente y prioritario en el estado de Campeche, México?

I.3. Objetivos.

Objetivo general.

Contribuir al conocimiento de la situación del dengue en el estado de Campeche, México entre los años 1990 y 2005.

Objetivos específicos.

1. Estudiar en el periodo 1990 – 2005 la incidencia de casos de dengue en el estado de Campeche.
2. Estudiar la presencia de anticuerpos a virus dengue en escolares de 7 a 14 años de edad en la ciudad de Campeche antes y después de los meses de lluvia en 1994, que permita saber la incidencia de esta infección en ese grupo durante ese año.
3. Estudiar las características de un brote de dengue ocurrido en un área rural en el año 1997, que nos permita conocer el comportamiento del dengue en esa zona.
4. Conocer la transmisión de virus dengue en febriles de etiología no precisada en el año 1999 y 2000 en el municipio de Campeche.
5. Conocer la seroprevalencia de anticuerpos a dengue en la población del estado de Campeche en el año 2002.

I.4. Novedad científica.

Se profundiza en el conocimiento del dengue en el estado de Campeche, brindando datos de interés clínico, epidemiológico y virológico en dieciséis años. Mediante un estudio multifactorial se reveló la presencia de los 4 serotipos del dengue relacionados

con el evento epidemiológico mas relevante en los tres quinquenios estudiados en el estado de Campeche.

I.5. Valor teórico.

Contribuir al conocimiento de la distribución de los virus del dengue en Campeche, México, y se observo el comportamiento heterogéneo que ha tenido el dengue en México en relación con otros países.

Publicación de dos artículos en Revista Internacional, participación en 5 eventos científicos (4 nacionales y 1 internacional).

De este estudio también se han realizado 4 tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica y Biología , y 2 de Licenciatura en Medicina.

Producción Científica:

Publicaciones:

Caracterización clínica y de laboratorio de un brote de dengue en un área rural de Campeche, México. Rev Cubana Med Trop 2008;60(2):136-140

Identificación de serotipos del virus dengue circulantes en el estado de Campeche, México. Rev Cubana Med Trop 2008;60(3): -----

Presentación en Congreso Internacional:

Prevalencia de anticuerpos a virus dengue en el Estado de Campeche, México. Congreso XVI Latinoamericano de Microbiología. Noviembre 2002.

Brote de dengue en un área rural de Campeche, México. Congreso XVI Latinoamericano de Microbiología. Noviembre 2002.

Presentación en eventos nacionales:

“ Dengue en escolares de la ciudad de Campeche” Trabajo presentado en la Semana Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Octubre 1999.

“Epidemiología del Dengue en México” Presentado en el Curso de Medicina Tropical de la Universidad Autónoma de Campeche. Mayo 2000.

“Dengue hemorrágico en el estado de Campeche” Conferencia en el Curso Peninsular de actualización para Médicos Generales. Julio 2007.

“ Hiperendemia del dengue en México” Trabajo presentado en la Semana Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Octubre 2007.

“Presencia de Fiebre Hemorrágica por Dengue en el Estado de Campeche en los años 2006-2007” Trabajo presentado en la Semana Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Octubre 2008.

Tesis dirigidas:

Prevalencia de Virus Dengue en la Ciudad de Campeche. Tesis de Licenciatura Abril 1995.

Sistema de Vigilancia de la Reproducción del Mosquito Aedes Aegypti Transmisor del Dengue en la Ciudad de Campeche. Tesis de Licenciatura Diciembre 1995.

Dengue Clásico y Hemorrágico en el Estado de Campeche. Tesis de Licenciatura Septiembre 1999.

Estudio epidemiológico del Dengue en la Población del Estado de Campeche de 1991-1998. Tesis de Licenciatura 1999.

I.6. Valor práctico.

Se puso en práctica una estrategia en base a la experiencia en la detección de casos de dengue, que permitió brindar los conocimientos adquiridos de su comportamiento en la región de Campeche; se obtuvo mayor experiencia, en la implementación de métodos de diagnóstico serológico con una alta sensibilidad y especificidad para la detección temprana del dengue.

Contribuir a la vigilancia epidemiológica del dengue en el estado de Campeche, su prevención y control.

Capítulo II. Revisión bibliográfica

II.1. Definición de Dengue

El dengue es la infección viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en el hombre; la infección por este virus causa un amplio espectro de trastornos clínicos desde la FD hasta las formas severas: FHD y el SCD.

II.2. Antecedentes históricos

El término dengue fue introducido a la literatura médica como una traducción del swahili: *dinga, dyenga o ki dinga pepo* que describe “un golpe súbito causado por un espíritu maligno”. Las primeras noticias de dengue en América son de 1635 cuando los colonizadores franceses informaron de una extraña dolencia que llamaron *coupe de barre*. Los términos de *knokkel-koorts* dado en Indonesia en 1779 y el de *breakbone fever o dandy fever* empleado en Filadelfia en 1780 fueron usados para describir la enfermedad que ahora conocemos como dengue (Carey 1971).

La primera epidemia descrita de una enfermedad clínicamente compatible con dengue ocurrió en Filadelfia en 1780 (Rush 1789; Halstead 1980). Los archivos españoles nos indican que el uso de la palabra Quebrantahuesos se le atribuye a una enfermedad febril en 1771 y, el uso de la palabra dengue en España fue en 1801 y se usó para describir una enfermedad febril aguda con dolor de huesos y coyunturas, hemorragia e ictericia. Estos textos evidencian que la palabra Quebrantahuesos era más utilizada y reconocida entre la población, y posteriormente los españoles dieron el nombre de dengue a esta enfermedad (Rigau 1998). Sin embargo, existen reportes de que en 1827 y 1828 se presentó una epidemia en el Caribe que cursaba con fiebre, artralgias y exantema identificando a esta enfermedad en Cuba como dengue (Siler, Hall, Kitchens, 1926; Carey, 1971)

Finlay en Cuba en 1881, identificó al mosquito *Aedes aegypti* como el agente transmisor de la Fiebre Amarilla, el mismo vector del virus del dengue, como fue demostrado en 1900 por Reed, Carroll, Agramonte y Lazear. Este descubrimiento justificó la implementación de un programa de erradicación de *Aedes aegypti* a finales de 1900 y principios de 1901, y representó la primera tentativa de las naciones del hemisferio para resolver un importante problema de salud, mediante una acción común. (Bustamante 1982).

En el caso de México, la clara intervención de *Aedes aegypti* en la propagación de la Fiebre Amarilla, detectada desde el siglo XV, se perfiló en gravísimas epidemias que asolaron Mérida y Campeche en 1648.

En 1963, México quedó libre de la especie transmisora de la Fiebre Amarilla urbana que prevaleció en nuestro país, resolviendo así un importante problema de salud pública y cumpliendo con un compromiso internacional. Por lo que se elaboró su programa original de vigilancia considerando su doble postura, de país libre de *Aedes aegypti* vecino a un país aún infestado y de país de inmigrantes y emigrantes, país con tránsito marítimo y aéreo con otros países infestados, de América del Centro, del Sur y del Caribe. México en los 60's desarrolló un Plan de Consolidación y Vigilancia para la detección del vector en los puertos marítimos, aéreos o fronterizos y fue concebido, planeado y ejecutado como fase preliminar al programa de vigilancia propiamente dicho. Sin embargo, el éxito alcanzado en la erradicación del vector en varios países durante los 60's se vio frustrado con la reinfestación pocos años después y se acompañó con el riesgo de epidemias de una infección transmitida por vector de reciente introducción en las Américas, el virus del dengue. La reinfestación se debió a las siguientes razones: a) no todos los países del Continente resolvieron erradicar *Aedes aegypti*, b) se disminuyó la vigilancia epidemiológica, así como la importancia política y social, los recursos humanos, financieros y materiales fueron escasos, c) la falta de disponibilidad de una vacuna efectiva, d) los países que todavía estaban infestados se convirtieron en fuente de reinfestación para los que estaban libres del vector, e) la vigilancia contra la reinfestación se redujo gradualmente hasta que resultó inadecuada para detectar reinfestaciones pequeñas; cuando se descubría la reinfestación, por lo general, se reaccionaba demasiado tarde, y los recursos para eliminarla (antes de que se generalizara) y para su control, solían ser insuficientes (SSA, 1986; OPS, 1995; Ibáñez y Gómez, 1995).

A medida que se deterioraron las Campañas de Erradicación de *Aedes aegypti* durante las décadas de 1970 y 1980, el mosquito proliferó y se propagó por casi todos los rincones de la región de las Américas, dando lugar a la paulatina reinfestación del continente. Se considera que la reaparición siguió del Caribe hacia Centroamérica y norte de Sudamérica durante la década de los 70's y fue pasando entre países contiguos o con gran comunicación hacia los extremos norte y sur del Continente. La actividad del dengue se intensificó alcanzando niveles alarmantes en la década de los 80's en Bolivia,

Brasil, Ecuador, Paraguay y Perú países sin dengue donde se registraron brotes explosivos (De la Fuente 1986).

Durante estas décadas, 70's y 80's, varios países que habían eliminado el vector volvieron a reinfestarse, entre ellos México (1975), Colombia y la mayoría de los países de Centroamérica; lo que representó un peligro de urbanización de la fiebre amarilla y diseminación del dengue. En 1982, la XXI Conferencia Sanitaria Panamericana confirmó la política de erradicación de *Aedes aegypti* propuesta por Soper (1967) y, recomendó a los países a que se ayudaran recíprocamente, mediante préstamos o subvenciones bilaterales y provisión de equipos y asesoramiento técnico. No obstante, la Reunión del Consejo Directivo de la OPS en 1985 aprobó una resolución recomendando “el Control o la Erradicación de *Aedes aegypti*”, por lo que interrumpió la firme política de Erradicación del vector acordada en 1947 y, estableciendo un cambio hacia “Programas para el Control de *Aedes aegypti*”. (Bol Of Sanit Panam, 1985; Clark, 1995).

II.2.1. Dengue en las Américas

La infección por dengue ha estado en las Américas por más de 200 años (OPS, 1995). En 1953-54, en Trinidad se aisló por primera vez el serotipo del virus 2 de casos no epidémicos (Mattingly 1967). En el siglo XX, la primera epidemia de FD en América, comprobada por el laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela en 1963-64, el virus DEN- 3 fue el serotipo circulante. En 1977, el serotipo DEN-1 fue inicialmente reportado en Jamaica, diseminándose a la mayoría de las islas del Caribe causando epidemias. El serotipo DEN-4 fue introducido en 1981, la fuente de dicho descubrimiento fue la serología hecha a dos turistas Norteamericanos que viajaron a San Bartolomé y St. Martín (Isturiz y Gubler, 2000), y desde entonces los tipos 1, 2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países donde *Aedes aegypti* ha estado presente. Vale la pena hacer una mención especial sobre la historia de la enfermedad en Cuba. Los casos de dengue se reportaron de una manera irregular hasta 1944. De 1945 a 1977, el dengue fue prácticamente desconocido en la isla. Durante la epidemia caribeña de 1977 el serotipo responsable de 477 438 casos fue el DEN-1. En 1981 apareció la primera epidemia de FHD en el hemisferio con un total de 344 203. Los estudios serológicos demostraron títulos de anticuerpos a todos los serotipos pero con una predominancia al serotipo DEN-2. Los casos predominaron en los menores de 10 años,

en el sexo femenino y en la raza blanca (Guzmán et al.,1984; Armada y Figueredo,1986).

De los 1 006 702 casos de Dengue reportados en las Américas en el período de 1980 a 1990, el 30% corresponde al área de América del Sur, el 4.8% a Centroamérica, el 43% al área del Caribe y 22% a México. Los países donde el Dengue se ha transmitido activamente son Colombia (7.7%), Brasil (17.2%), Cuba (34.2%), Puerto Rico (4.5%) y México (22%) (Figueiredo, Cavalcante, Simoes,1990; Pinheiro y Corber,1997). Cuba destaca como uno de los contribuyentes más notables, no sólo por el número de casos sino por ser el primer país en las Américas que sufrió una epidemia de dengue hemorrágico (Kourí et al.,1989; WHO 2000a).

De 1980 a 1988, se reportaron 302 330 casos de FHD en 24 países de la región, siendo Colombia el país con el mayor número de casos reportados (80 310), seguido por Brasil (55 150), Venezuela (54 514), Puerto Rico (41 942), Nicaragua (36 257) y Cuba (10 517). (Pinheiro y Corber,1997; WHO 2000b). En diciembre de 1989, Venezuela reportó una epidemia con 12 220 casos de dengue y 3108 casos de dengue hemorrágico. Se reportaron 73 defunciones y los serotipos identificados fueron DEN-1, DEN-2 y DEN-4 (Barrera et al.,2002). Durante 1990 y hasta enero de 1991, la OPS reportó 36167 casos de dengue en Brasil de los cuales 237 fueron diagnosticados como dengue hemorrágico con 3 defunciones. Los serotipos circulantes identificados fueron DEN-1 y DEN-2 (OPS 1995; Teixeira et al.,2001). La FHD es considerada una de las enfermedades emergentes mas importantes en el continente.

El serotipo DEN-3 reaparece en 1994 en Nicaragua, este serotipo constituye un riesgo importante ya que genotipos de él se asocian a la forma hemorrágica de la enfermedad (Uzcategui et al.,2003; Figueroa y Ramos,2000).

Durante la última década la FD se ha diseminado dramáticamente en Latinoamérica y los países del Caribe infestados con *Aedes aegypti*, siendo en el año de 1995 cuando se presentó una epidemia regional con más de 30 000 casos de FD y 5 000 casos de FHD, siendo los serotipos 1, 2 y 4 los aislados durante la misma, predominando el serotipo 2 (Pinheiro y Corber,1997; Salas, Tovar, Barreto,1998; Isturiz y Gubler,2000).

En el año 2000, 27 países de Centro, Sudamérica y el Caribe reportaron transmisión de dengue, 17 reportaron casos de FHD y 10 reportaron muertes por FHD, la región más afectada fue Sur-América, principalmente los países de Brasil, Ecuador, Colombia, Paraguay y Venezuela (Torres J, Torres JR, Torres CG,2002).

De acuerdo a los reportes de la OPS, Brasil se ha mantenido constante en el reporte de casos tanto de FD como de FHD y durante el período de 1999 al 2003 ha notificado más de 200 000 casos por año.

También llama la atención la disminución de casos en los intervalos interepidémicos, así como su incesante diseminación por la región.

Las experiencias en las Américas, en particular la de la epidemia de dengue en Santiago de Cuba (Valdés y cols.,1999), han demostrado que aun en condiciones óptimas de control de las densidades vectoriales, la transmisión de los virus dengue puede establecerse de manera epidémica si no se mantiene una vigilancia epidemiológica estricta y permanente y un control del vector adecuado y sostenible.

II.2.2. Dengue en México

La República Mexicana (Figura 1) tiene una extensión superficial de 1.972, 547 km², con una población de 100.263, 659. El país se divide en 32 estados.



Figura 1. Ubicación geográfica de la República Mexicana.

En México, el dengue se detectó por primera vez en 1941, en esa ocasión se registraron 6 955 casos; sin embargo, las cifras fueron descendiendo a medida que avanzaba la eliminación del vector, misma que se certificó en 1963 (Ramos y cols.,1998b). El vector poco a poco fue recuperando terreno, de tal manera que en 1978 se registra nuevamente un caso de dengue en Tapachula, Chiapas, ciudad fronteriza de México con

Guatemala (SSA 1996). La reinfestación casi inmediata y el reinicio de la transmisión a finales de los años setenta, coloca al dengue como una enfermedad reemergente en México, éste es un ejemplo en el que un problema infeccioso que fue controlado en el pasado, reaparece ahora como problema de salud pública (Kumate 1989). Entre los factores asociados a la reintroducción del dengue se encuentran principalmente fenómenos demográficos asociados al proceso de industrialización, lo que produjo el desplazamiento de las poblaciones rurales a los centros urbanos en busca de empleo, problemas de abasto de agua, baja percepción del riesgo, entre otros.

El serotipo 1 se identificó en Veracruz en 1982 y actualmente se encuentra en toda la República Mexicana. En 1983, se identificó el serotipo 2 en el estado de Guerrero y fue el responsable del mayor número de casos de FD en la región del Pacífico, diseminándose rápidamente hacia los estados de Campeche, Colima, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Este serotipo se reportó asociado a las epidemias de 1984. El serotipo 4 se identificó por primera vez en Oaxaca en 1983, se ha diseminado a Veracruz, Campeche, Yucatán, Tamaulipas, Puebla, Hidalgo, Morelos, Jalisco y Sinaloa principalmente; este serotipo fue responsable de la epidemia que sufrió Yucatán en 1984. La distribución geográfica de este serotipo ha seguido el mismo avance de la epidemia que sufrió México en la década de los 80' (Ramos 1998).

El dengue se diseminó rápidamente por todo el territorio nacional en menos de 10 años hasta afectar 29 estados, aunque Narro y Gómez (1995) reporta que en 1994, el 64% de los casos se concentraba en sólo ocho entidades federativas: Veracruz (13%), Guerrero (10%), Oaxaca (8%), Sinaloa (7%), Chiapas (7%), Yucatán (7%), Coahuila (6%) y Campeche (6%).

A partir del año de 1990, se registró un incremento en el número de casos de FHD, los primeros casos de FHD identificados en la República Mexicana se presentaron en el estado de San Luis Potosí y posteriormente en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Colima y Guerrero (Briseño et al., 1996). En 1996, la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), reportó 20,000 casos de dengue, de los cuales el 4% evolucionaron a FHD, debido a esto, el dengue es considerado un problema de salud pública prioritario en México. Actualmente el predominio de los casos de FHD se ubica en los estados del Golfo (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica – SINAVE 2003).

Para el año 2003 se reportó que la tasa de morbilidad ha disminuido a 30 casos por cada 100 000 habitantes comparado con otros países afectados (400 casos por cada 100 000

habitantes), por lo que se considera que la enfermedad se ha venido controlando a lo largo del tiempo (SINAVE 2004).

El escenario epidemiológico en México coloca al dengue como un problema emergente de salud pública, debido al riesgo de que se presenten epidemias de FHD con alta letalidad, sobre todo en la población infantil. Esta situación se evidencia por la amplia circulación de los cuatro serotipos, la coexistencia de poblaciones inmunes a unos serotipos y susceptibles a otros, las altas densidades del vector en zonas urbanas de las regiones tropicales y subtropicales del país y al incremento de la transmisión de dengue. A pesar de lo antes expuesto, los esfuerzos para controlar las epidemias podrían ser afectados fuertemente por las condiciones socioeconómicas de la población y a la alteración de la ecología debido a una desmedida urbanización, factores que podrían favorecer el desarrollo del vector. En la actualidad, el dengue se encuentra reportado en 24 de los 31 estados que conforman la República Mexicana (SSA, 2005).

El control de la enfermedad principalmente se ha abordado por medio del control químico del vector, pero hay indicios que sugieren que existe resistencia por parte del mosquito hacia algunos de los insecticidas utilizados (Gratz, 1999; Winch et al., 1991). Siendo importante considerar la constante agresión de estos compuestos químicos a los ecosistemas, ya que los residuos de muchos insecticidas permanecen durante mucho tiempo sin ser degradados (Pinheiro 1996).

La situación en México no es muy alentadora, sin embargo, se observa una ligera tendencia a la baja en el número de casos de dengue registrados en los últimos años (Díaz et al., 2002). Al parecer las medidas implementadas por la Secretaría de Salud están contribuyendo en el control de la población del mosquito en las zonas de alta endemia, y con ello se ha logrado reducir el número de casos de FD y FHD.

II.2.3 Ubicación Geográfica del Estado de Campeche.

Se localiza en la parte occidental de la Península de Yucatán, al sureste de la República Mexicana, entre los paralelos 17° 49' - 20° 51' de latitud norte y los meridianos 89° 05' - 92° 28' de longitud oeste. Limita al norte con el estado de Yucatán; al sur con la República de Guatemala; al este con el estado de Quintana Roo y al oeste con el Golfo de México.

Su extensión territorial es de 56,858 kilómetro cuadrados. Actualmente está conformado por once municipios, con una población de 705,269 habitantes (INEGI 2000).

CAMPECHE

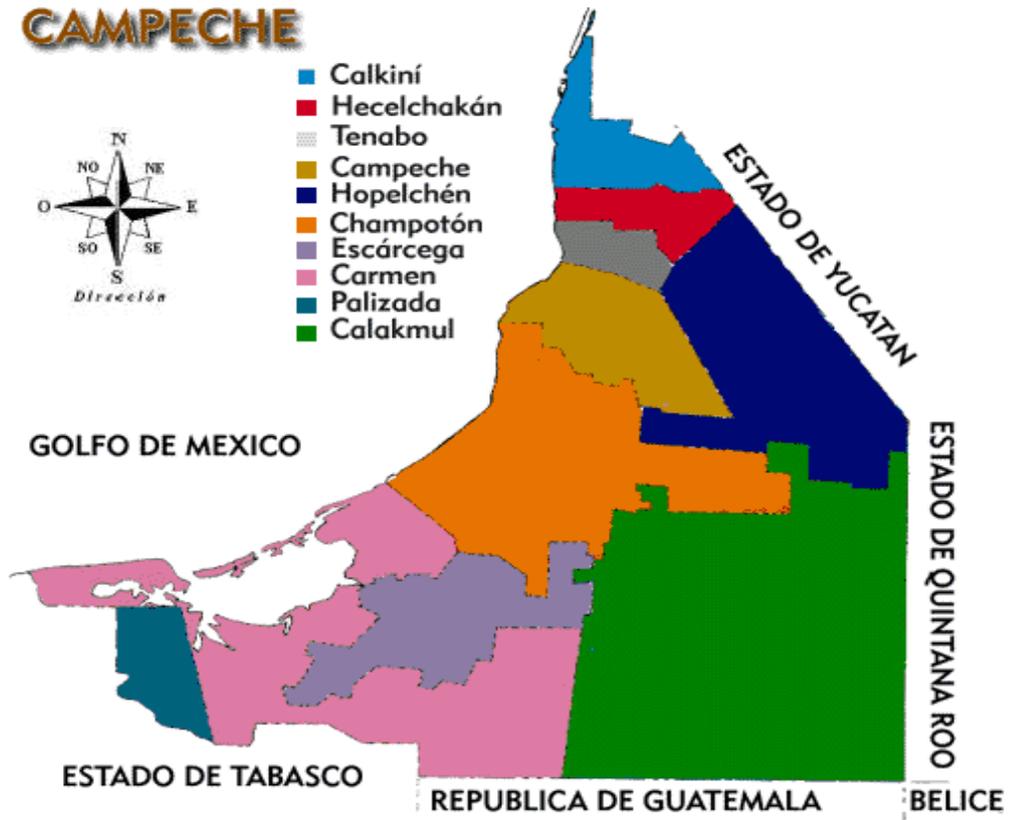


Figura 2. Ubicación geográfica del Estado de Campeche

II.2.4. Dengue en Campeche

En Noviembre de 1979 se registró la presencia de *Aedes aegypti* en el estado de Campeche, un año después se detectaron los primeros casos de FD, cuyo agente etiológico fue el serotipo 1; este serotipo se diseminó por toda la región, habiendo un incremento de los enfermos en los años 1987 y 1988.

En Abril de 1988 se registró un brote en la Isla del Carmen (que pertenece a Campeche), y se obtuvieron 278 muestras serológicas de pacientes febriles con síntomas sugestivos de FD, resultando 268 positivas al serotipo 1.

En la década de los ochenta se comenzaron a hacer estudios limitados de vigilancia epidemiológica en el estado, los servicios de salud, carecían de laboratorios para el diagnóstico serológico por lo que estas muestras tenían que enviarse al Instituto de Salubridad en Enfermedades Tropicales (ISET) en la Ciudad de México, para su procesamiento. Por lo que muchos casos no fueron notificados, existen subregistros durante esta década y principios de los noventa, ya que no todos eran reportados ni confirmados por laboratorio. Por lo anterior se establecieron los siguientes parámetros para considerar un caso por virus dengue.

Caso sospechoso: aquel paciente con un cuadro febril inespecífico, que proviniera de una zona endémica. Caso confirmado: toda persona con fiebre, cefalea, mialgias y artralgias, que proviniera de una zona endémica y que se confirmara por laboratorio la infección (SSA,1983).

Las pruebas de laboratorio que se realizaban para confirmar el diagnóstico fueron la inhibición de la hemaglutinación (IH) en muestras pareadas de suero y el aislamiento del virus mediante cultivos celulares. Como se mencionó anteriormente, estas muestras se enviaban a la capital del país para su procesamiento. En los primeros años no se realizó un seguimiento de los pacientes, porque la prueba que se empleaba era la IH que requería de muestras pareadas, método que dificultaba el seguimiento confirmatorio de los enfermos al tratar de obtener la segunda muestra de suero, ya que con frecuencia el paciente se negaba. Esto cambió favorablemente al implementarse la prueba de MAC-ELISA, para la detección de anticuerpos IgM como método de diagnóstico de infección reciente.

Desde antes de que reapareciera el dengue en Campeche, existía en forma permanente la verificación entomológica con brigadas especiales, intensificándose las medidas de control cuando se reportaron los primeros enfermos, en las localidades urbanas, ya que

entonces los estudios entomológicos que se realizaban en todo el estado, no registraban al vector en las localidades rurales.

II.3. Vector

Aedes aegypti es el vector principal del dengue. Se encuentra en todo el mundo tropical por su gran facilidad de adaptación y proliferación. Es originario de África, y en barco llegó a las Américas al inicio de las exploraciones y la colonización. Vive en regiones cálidas, tropicales y subtropicales en áreas preferentemente urbanas, periurbanas y rurales en convivencia constante con el humano, por lo que se le considera un vector doméstico. Es uno de los vectores más eficientes de la familia de los arbovirus, ya que en zonas densamente pobladas es predominantemente antropofílico. Su hábitat preferido es casi cualquier objeto que pueda retener agua limpia, como llantas, floreros, botellas, etc. (WHO, 1998b).

Aedes aegypti tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: La fase acuática o larvaria o de estadios inmaduros, en la cual existen 3 formas evolutivas diferentes; huevo, larva y pupa; este período tiene una duración promedio de 7 a 10 días, pero puede prolongarse a más del doble, cuando la temperatura disminuye o los alimentos son escasos, o bien reducirse hasta 5 días cuando hay alimento y la temperatura oscila entre los 25 y 30⁰C. Y la fase aérea o de adulto sólo corresponde al mosquito o imago que vuela (SSA 1997).

Otro vector de importancia epidemiológica es *Aedes albopictus*, de amplia distribución en Brasil. En Asia se ha asociado a epidemias de dengue. Fue introducido en América en 1985, difundiéndose en varios países. En el periodo 2001-2002 fue el vector transmisor durante la epidemia de dengue reportada en Hawai (Wilson y Chen,2002).

La abundancia del vector esta estrechamente ligada a la presencia del agua; mientras mas abundante sea, mayores son las posibilidades de encontrar un sitio para oviponer los huevecillos. Las regiones con altos niveles de precipitación son las zonas tropicales, donde la vegetación es abundante y proporciona estupendos lugares sombreados de reposo para el vector, es en estos sitios donde se favorecerá la transmisión, al aumentar las densidades del vector, el contacto con diferentes individuos y la probabilidad de encontrar un individuo virémico con el cual iniciar la transmisión.

Factores condicionantes de la densidad vectorial en México

La extensa infestación *por Aedes aegypti* en el territorio mexicano y la rápida diseminación de los virus están determinados, tanto por factores sociales como económicos, culturales e inclusive ecológicos. Las condiciones ecológicas de cada región se reflejan en el clima, el patrón pluvial, el tipo de vegetación, y las formas en que se organiza el hombre para adaptarse a ellas.

Tabla 1. Condiciones ecológicas que favorecen la densidad vectorial en México

| CONDICIÓN | CARACTERÍSTICAS |
|-----------------------------------|---|
| Altitud | 1,200- 1760 mts. Snm |
| Latitud | 45 ⁰ latitud norte y los 35 ⁰ latitud sur |
| Temperatura media anual | 15 a 40 ⁰ C * |
| Precipitación pluvial media anual | >1,000 mm ³ * |

FUENTE: SECRETARIA DE SALUD. PALUDISMO Y DENGUE DE LA ERRADICACIÓN A LAS ZONAS DE RIESGO.

En el interior de cada centro urbano, en las áreas con carencia de servicios públicos como la dotación de agua potable y recolección regular de basura, se encuentran las mayores densidades vectoriales y probabilidades de transmisión. Estas son las zonas donde los migrantes confluyen y se establecen en áreas con malas condiciones de vivienda convirtiéndose en grupos susceptibles y de mayor riesgo para la infección.

La densidad de población es un factor fundamental en la definición del patrón de transmisión por las siguientes razones: un mayor número de individuos en un área favorece el contacto del vector especialmente si las densidades del vector son bajas; el recurso alimenticio (sangre para el mosquito vector) es abundante y por lo mismo, la probabilidad de que se transmita la infección es mayor y con tasas de ataque más altas que en una situación donde son pocos los individuos disponibles y que, como en las áreas rurales, se encuentran más dispersos que en el barrio de una ciudad. En poblaciones cerradas y pequeñas la transmisión tardaría más en llegar, sería breve en duración, ya que los sujetos susceptibles se agotarían muy rápido. En las ciudades medias o grandes la probabilidad de introducción de la transmisión es mayor dado los canales de comunicación y migración, la transmisión puede persistir más tiempo al encontrar a un grupo mayor de individuos susceptibles, pudiendo afectar a más personas (Reiter et al.,1995).

El medio ambiente ejerce su influencia al determinar la diversidad de hábitats larvarios disponibles en las diferentes zonas rurales y urbanas.

La abundancia de mosquitos y su longevidad son factores del vector influidos por el medio ambiente y que están íntimamente ligados a su capacidad de transmisión. Su longevidad determina la posibilidad de que pueda transmitir la infección ya que debe ser mayor que el periodo de incubación extrínseco y la longevidad también determina el tiempo que duraría como vector de la infección (Rodhain y Rosen,1997).

La abundancia del vector también está íntimamente ligada a la presencia de agua; mientras más abundante sea ésta, mayores serán las posibilidades de encontrar un sitio para depositar los huevecillos. Las zonas con altos niveles de precipitación por ende son las zonas tropicales donde la vegetación es abundante lo que proporciona estupendos lugares de reposo para los mosquitos. Las altas densidades del vector son un factor determinante para el desarrollo de la enfermedad, ya que incrementan la tasa de picadura (número de picaduras por hombre por día), la probabilidad de alimentarse de un individuo enfermo y la sucesiva transmisión de la infección (Lounibos,2002).

El rango de dispersión de *Aedes aegypti*, antes considerado hasta los 1200 metros sobre el nivel del mar, ha ido aumentando desde su reintroducción en América, en México se le ha encontrado hasta los 1760 metros de altitud (Ramos 1988; Herrera et al.,1992). En las áreas de menor altitud el dengue se ha transmitido en forma epidémica. Las condiciones del hábitat del vector y el clima varía de acuerdo a la altitud, dada la influencia que ejerce en la precipitación pluvial, la temperatura media anual, el tipo de vegetación, etc. Es a menor altitud donde se presentan las mejores condiciones para el desarrollo del vector. La humedad relativa, la vegetación y el clima le proporcionan medios para una mejor sobrevivencia. Por ejemplo, en el caso de factores epidemiológicos se ha reportado transmisión asociada con fenómenos climatológicos como “El Niño” (Hales et al.,1999).

Estudios en Tailandia demostraron que la incidencia de FHD estuvo relacionada con los meses de una temperatura media de 28°C o más (Epidemiologic,1998). También en México, en las localidades con temperatura media anual mayor a los 25°C, se demostró una mayor prevalencia de anticuerpos a los virus que en aquellas regiones con un clima más templado (Espinoza y cols.,2003). La temperatura, la precipitación pluvial junto con la vegetación generan condiciones ambientales de mayor humedad relativa que también favorecen el desarrollo larvario de los mosquitos e incrementan la supervivencia de los mosquitos adultos.

La eliminación del vector en México es poco factible, en virtud de los niveles de infestación en los Estados Unidos y su decisión de no erradicarlo; lo más seguro es que se tengan reinfestaciones continuas. La estrategia será intensificar las acciones de control de *Aedes aegypti* que ya se encuentra bien establecido en nuestro territorio. En la medida en que se controlen los criaderos de *Aedes aegypti* se tendrán más posibilidades de contrarrestar también la presencia de *Aedes albopictus* (Orta, Mercado, Elizondo,2005).

II.4. Virus

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* del cual existen cuatro serotipos antigénicamente relacionados (Mackenzie, Jones, Westaway,1999; Monath y Burke,2001). Al ser transmitidos por artrópodos se agrupan entre los Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). El término Arbovirus incluye agentes causales de algunas de las enfermedades epidémicas y enzoóticas más importantes de la patología infecciosa de origen viral. La característica unificadora de la biología de los Arbovirus es su desarrollo en ciclos de transmisión donde el virus se multiplica en dos sistemas biológicos filogenéticamente diferentes: vertebrados e invertebrados.

II.4.1. Características del virus

Los viriones del dengue miden de 40 – 60 nm de diámetro tienen forma esférica, conformada por una nucleocápside con simetría icosaédrica de aproximadamente 30 nm de diámetro, recubierta de una bicapa lipídica de aproximadamente 10 nm. La partícula viral muestra hacia la superficie unas proyecciones en forma de anillos, de 7 nm de diámetro que son la proteína de envoltura E (Monath y Burke 2001). Su genoma consiste de una cadena sencilla de ARN, de polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases (kb), funcionando como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación. El ARN codifica tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NSs). La proteína C forma la nucleocápside del virus y está rodeada por una bicapa de lípidos con la que interacciona la proteína transmembranal o de envoltura E. La proteína de membrana M es un polipéptido no glicosilado e interacciona con la proteína E. De la proteína E dependen actividades biológicas muy importantes: media la unión y

puede clivar a la NS3 en el dominio helicasa. Se encontró además que tanto la NS3 como la NS5 son capaces de convertir la forma replicativa en intermediario replicativo. Además del reconocimiento por medio de anticuerpos específicos, los serotipos pueden ser fácilmente distinguidos por medio del mapeo de sus oligonucleótidos y por hibridación de la fracción 40S del ARN. Estas herramientas permiten determinar el origen y la evolución de los virus responsables de las epidemias en diferentes nichos ecológicos y geográficos (Kanesathasan et al., 1998).

Los estudios de comparación del genoma de los diferentes serotipos revelan una relación genética muy cercana entre los serotipos DEN-1 y DEN-4 (70% de homología) y entre los serotipos DEN-3 y DEN-4 (50% de homología) (Chungue et al., 1995). El DEN-2 no parece guardar una relación cercana con los otros serotipos (Blok y Gibbs 1995). El análisis genético de los virus dengue aislados en diferentes regiones del mundo también ha demostrado la ocurrencia de variaciones genéticas dentro de cada serotipo denominadas genotipos. El DEN-2, por ejemplo, tiene cinco genotipos de acuerdo con su origen geográfico (Lanciotti et al., 1994).

El mapeo del ARN ha demostrado 50 a 75% de variación en la composición de oligonucleótidos en los virus DEN-1 aislados en el Sureste Asiático, África y el Caribe. (Guzmán et al 1996; Vorndam, Nogueira, Trent, 1994).

Descifrar las diferencias en su estructura molecular es de vital importancia para el entendimiento de las formas de replicación del virus, sus interacciones con las células blanco y los determinantes antigénicos esenciales para el desarrollo de la inmunidad y la definición de la virulencia. La variación genética y su correlación con la patogenicidad en humanos se ha observado en otros Flavivirus, por lo que los casos de FHD y SCD pudieran estar asociados a variantes del virus con un mayor potencial patógeno y que este fenómeno pudiera estar vinculado con los casos de FHD/SCD en el transcurso de una infección primaria causada por los virus de dengue (Thant, Morita, Igarashi, 1996). Estas características tienen efectos importantes sobre el comportamiento de la infección en diferentes regiones y poblaciones y muchas de estas características están aún por descubrirse, conocimientos que podrían contribuir a desarrollar una vacuna eficaz en el futuro.

II.5. Patogenia

El dengue es transmitido al hombre por la picadura de la hembra hematófaga de mosquitos *Aedes aegypti*. Estos lo adquieren al ingerir sangre de un individuo

infectado. La replicación del virus en el artrópodo es parte esencial de su ciclo de vida. Esta se lleva a cabo en el intestino del insecto con una subsiguiente propagación a las glándulas salivales. Los virus presentes en las glándulas salivales pasan al hombre durante la alimentación del mosquito con sangre de un nuevo huésped, inoculando el virus en las células de los distintos estratos de la dermis, mediante picaduras continuas a distintos niveles de profundidad. Una vez inoculado el virus, éste infecta principalmente células fagocíticas del sistema inmune tales como fagocitos, macrófagos (Kurane et al.,1994; Lei, Eeh, Chen 2001), células de Langerhans (Wu 2000) y células dendríticas (Tassaneetrithep et al.,2003; Shuenn-Jue et al.,2000). Las células infectadas propagan el virus a otros tipos celulares al emigrar a otros ganglios linfáticos como parte de su función dentro del sistema inmune. Una vez establecido en los ganglios linfáticos, el virus es capaz de infectar otros tipos celulares como linfocitos T y células nerviosas. El virus también puede propagarse libremente hacia el torrente circulatorio durante la migración de las células infectadas o viajar libremente en el plasma, infectando otras estirpes celulares permisibles a la infección, principalmente células endoteliales (Kurane y Ennis,1997; Avirutnan et al.,1998), linfocitos B (King et al.,1999) y órganos del sistema reticuloendotelial (Burke y Monath,2001). Finalmente el ciclo de la infección viral se completa cuando el nuevo huésped infectado es picado por otro mosquito hembra, la cual se infectará y transmitirá posteriormente el virus a un nuevo huésped (Gubler 1998; Rice 2001).

La patogenia de la enfermedad es muy compleja, en la cual se involucran factores que dependen tanto del virus como del hospedero, en consecuencia es común observar un amplio espectro en la severidad de la enfermedad.

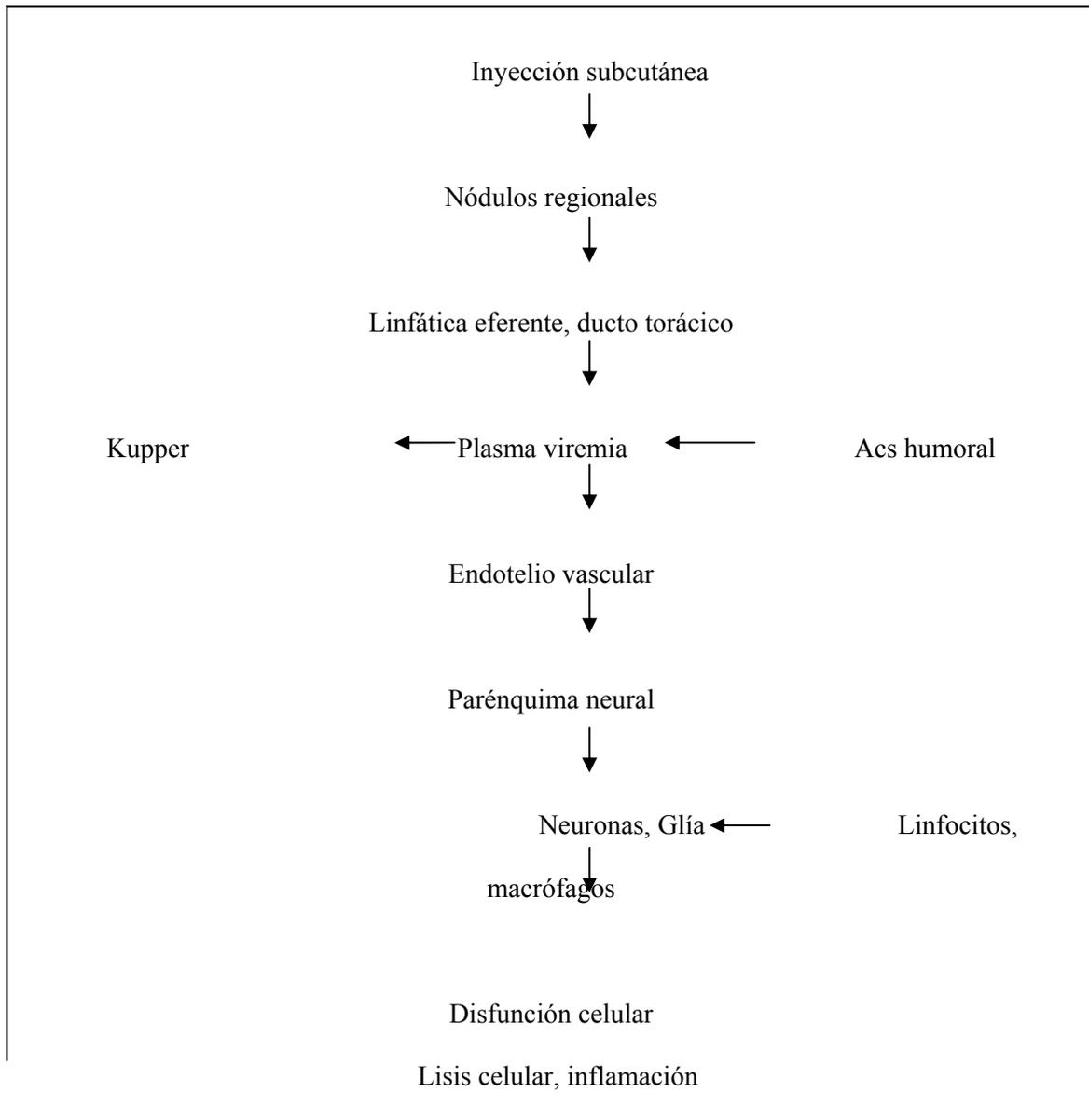


Figura 3. Etapas en la patogénesis de la infección por Flavivirus

Actualmente los mecanismos que desencadenan los cuadros patológicos graves de la infección del virus dengue no son claros, se propone que cepas más virulentas están asociadas a esta forma grave de la infección, así como factores genéticos y la propia respuesta inmunológica (Groen et al.,1999). Los primeros anticuerpos formados en las infecciones primarias son IgM y están dirigidos principalmente contra los determinantes antigénicos tipo-específico del virus dengue en la proteína de envoltura E. Las infecciones secundarias producen anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos del grupo Flavivirus. Estos complejos formados por IgG1 e IgG3, son las subclases que mas se producen en las infecciones virales y activan al complemento en su componente C1,

se unen firmemente a los receptores Fc de los monocitos y macrófagos (Bielefeldt-Ohmann 1998).

Con respecto al establecimiento de FHD por la presencia de anticuerpos facilitadores, se sabe que personas que experimentan una infección primaria por el virus dengue desarrollan anticuerpos específicos contra el virus de tal manera que individuos que sufrieron una primo-infección son inmunes en una infección secundaria contra el serotipo homólogo pero no a una infección secundaria con un serotipo heterólogo (Gubler y Clark,1995). Cuando la infección secundaria está dada por un serotipo diferente a la de la infección primaria también se estimula la producción de anticuerpos comunes a ambos serotipos (no neutralizantes), la presencia de bajos niveles de anticuerpos de reacción cruzada formarán complejos con el virus, lo cual le dará más ventaja para una infección más exitosa. De ésta manera, el virus no sólo será internalizado por la célula blanco sino también por los receptores Fc presentes en los monocitos, por lo que la infección se verá aumentada por la presencia de dichos anticuerpos facilitadores (ADE) (Gubler 1998; Lin, Wang, Lei,2002). Los monocitos infectados liberan varios mediadores vasoactivos que pueden ocasionar el incremento en la permeabilidad vascular y las manifestaciones hemorrágicas que caracterizan a la FHD (Monroy y Ruiz,2000). Una vez que los virus son internalizados, algunos antígenos virales serán presentados por las células infectadas en el contexto de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) originando la activación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, macrófagos y células endoteliales; las cuales producirán grandes cantidades de citocinas incluyendo el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleucina 1 e Interleucina 6, además de la activación del complemento y plaquetas (Green et al.,1999). El TNF induce aumento en la permeabilidad capilar per se, y el Interferón γ lo hace ya que incrementa la producción de TNF- α por monocitos activados (Rothman y Ennis,1999), e interacciona con éste para inducir la activación de células endoteliales *in vitro*, además de incrementar la expresión de moléculas del sistema HLA de clase II, aumentando la presentación de antígenos virales, estimulando la producción de anticuerpos y sus receptores Fc (Diamond et al.,2000). Otro de los marcadores de activación inmunológica son los niveles de receptores solubles para IL-2, TNF, CD4 y CD8, de manera especial este último, corroborándose un papel especial de los linfocitos T citotóxicos en la génesis del dengue (Green et al.,1999). La activación del complemento sobre la superficie de las células infectadas que se encuentran expresando antígenos virales de dengue son reconocidas por anticuerpos antidengue o bien durante

una infección secundaria con serotipo heterólogo, por lo que el número de monocitos infectados se verá favorecido desencadenando un aumento en la activación de linfocitos CD4⁺ de reacción cruzada y linfocitos CD8⁺ de memoria y citotóxicos, además de la acción de citocinas y de otros mediadores (Kittigul et al.,2000). Al óxido nítrico se le considera un mensajero intercelular el cual en cantidades picomolares constituye un mediador de diversos procesos fisiológicos, mientras que en cantidades nanomolares que se presentan como respuesta a la estimulación por citocinas o endotoxinas, éste puede tener efectos fisiopatológicos graves como choque (Kreil y Eibl,1996).

También se han encontrado diferencias a nivel de la composición de aminoácidos tanto en proteínas estructurales como en las proteínas no estructurales a nivel de la secuencia de nucleótidos (Huang et al.,1999; Rothman y Ennis,1999). Adicionalmente se han encontrado cambios dentro de los genomas de diversos aislados que permiten hacer más eficiente la replicación viral (Leitmeyer et al.,1999).

El riesgo de padecer FHD/SCD en casos de infecciones secundarias es de 1 a 6 %, que es 100 veces más alto que en casos de infecciones primarias. Entre los factores de riesgo que se han identificado destacan los siguientes: personas jóvenes (menores de 15 años), sexo femenino, buen estado nutricional, un intervalo de hasta veinte años entre la infección primaria y la secundaria (Guzmán et al., 1999a), la secuencia de infección y la cepa de virus.

Se ha sugerido que las diferencias en la virulencia del virus son determinantes en la patogenia del dengue. Los primeros casos masivos de FHD en el Continente Americano coincidieron con la introducción de una nueva cepa de dengue 2 parecida a la que circulaba en el Sureste de Asia (Rico-Hesse,1990). Lo mismo pasó cuando el dengue 3 se introdujo en América (Gubler y Clark,1995). Es difícil, sin embargo, distinguir entre los efectos de la introducción de una cepa viral, de otros factores que pueden jugar un papel en la severidad de la enfermedad.

No todos los individuos que tienen una respuesta secundaria desarrollan cuadros severos cuando son infectados por segunda ocasión, además de que se han informado casos de FHD en el curso de una infección primaria (Rothman y Ennis,1999). Por otra parte, 90% de los casos de FHD/SCD ocurre en los niños mayores de un año y 99% de ellos tienen evidencia de una infección previa. Los menores de un año con FHD/SCD con infecciones primarias, son hijos de madres ya inmunes y este tipo de casos han sido detectados en Burma, Tailandia, Indonesia, Cuba y Puerto Rico (Watana et al.,2003; Singh et al.,1998; Martínez y cols.,1993; Rigau,1997).

Algunos estudios han señalado al dengue 2, como el serotipo causante de cuadros más sintomáticos, severos y con mayor predisposición a manifestaciones hemorrágicas (Guzmán y Kourí,2002; Vaughn y Green,2000). Además, debe tomarse en consideración que la biología molecular ha identificado dos genotipos principales en este serotipo: el genotipo Asiático del dengue 2 que ha sido relacionado con la mayoría de las epidemias de FHD en el sudeste de Asia y en América (Cuba en 1981), y el genotipo americano, de menor virulencia, que no ha llegado a producir casos de FHD en infecciones secundarias (Watts, Porter, Putvatana,1999), el cual está siendo desplazado por la introducción en América del serotipo 2, proveniente del sureste de Asia (Vaughn y Green, 2000).

Estudios de epidemiología molecular han proporcionado evidencias a favor de que las diferencias entre cepas virales podrían determinar la incidencia de la FHD en aquellos individuos que han experimentado una infección primaria (Rothman, y Ennis, 1999). Este hecho fue observado durante diferentes brotes en países de América donde se aisló una cepa de origen asiático, la cual difiere en la secuencia de nucleótidos, con respecto a la cepa anteriormente aislada (Rico-Hesse et al, 1997; Loroño et al., 2004). Existen reportes que títulos altos de viremia tres días después del inicio de la fiebre se correlacionan con las formas severas de la enfermedad. La asociación concurrente entre la severidad de la enfermedad, el título de viremia y la evidencia serológica de infección secundaria sugiere que la respuesta inmune de reactividad cruzada puede ser un factor importante en la patogénesis del dengue en niños que viven en regiones hiperendémicas de dengue (Vaughn y Green, 2000; Murgue et al., 2000).

II.6. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al dengue como la segunda enfermedad re-emergente más importante entre las enfermedades tropicales y como la principal enfermedad viral transmitida al hombre por artrópodos. Se estima que cerca de 2.5 billones de personas procedentes de zonas urbanas, periurbanas y rurales están en riesgo de contraer la infección, con una incidencia anual de 50-100 millones de casos de FD y de 25-500 mil casos de FHD (PAHO, 2000; Gibbons y Vaughn, 2002).

La OMS estima que al menos 100 países son endémicos de FD (Rodríguez, 2002). La FHD es la principal causa de hospitalización y muerte de niños en los países del sudeste asiático (Gubler, 1998).

De acuerdo a estimaciones de la OMS, en la región Sur-Este de Asia viven 1.5 billones de habitantes (24 % de la población mundial), de los cuales 1.3 billones de personas se encuentran en zonas de riesgo para FD o FHD, es decir habitan en zonas tropicales y subtropicales. Cabe mencionar que anualmente siete países reportan casos nuevos de dengue (OMS, 2004).

Se calcula que durante los brotes, la incidencia de dengue en los países del sureste asiático generalmente sobrepasa los 100,000 casos y el número de muertes por dengue hemorrágico continúa siendo alto, sin embargo, la tasa de letalidad ha fluctuado entre 2 a 2.5% hacia 1990, mostrando una tendencia a la disminución y manteniéndose estable hasta el 2001 (OMS, 2004). En el 2001 se reportaron más del doble de casos que en 1995 en el continente Americano (WHO, 2002), por lo que es evidente que la incidencia ha aumentado (Clark, 2002). En las Américas, México es uno de los países más afectados por el virus dengue, especialmente en el año 2004, cuando la secretaria de salud pública de este país, reportó que casos de FD y FHD se habían presentado en veintitrés estados de la república (SINAVE, 2005).

Los cuatro serotipos del dengue han circulado simultáneamente, siendo la causa de epidemias importantes en las Américas, así en la década de los noventa Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua tuvieron epidemias importantes (PAHO, 1999). Para septiembre del 2002, numerosos casos de FD y FHD fueron reportados a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por los países de Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Cuba, Honduras, Perú, Venezuela, Barbados y Trinidad & Tobago (PAHO, 2002).

En Brasil, más de 711 919 casos de dengue, así como 2229 casos de FHD y 130 muertes, fueron reportados en 2001; el serotipo predominante fue el 3, aunque también el serotipo 1 y 2 estuvieron presentes (PAHO, 2002). Esta epidemia afectó más severamente al estado de Río de Janeiro (Barbosa, Siqueira y Coelho, 2002).

Para el año 2003, los países más afectados por FHD fueron Brasil (324 512), Colombia (46 504), Venezuela (26 996), Costa Rica (19 669), Honduras (13 184) y Ecuador (9 628) (CDC, 2004).

Existen regiones que han sufrido dengue en forma repetida, mientras que existen otras donde aún no se ha presentado. Más que considerarlo como un evento aleatorio o de suerte, la transmisión del dengue es más efectiva en las zonas bajas por debajo de los 1000 metros (OPS, 1995), y tropicales mientras que se ve impedida a temperaturas bajas y a altitudes mayores. La temperatura, el clima y la altitud son los factores predictivos

más importantes de las tasas de infección en diferentes regiones. De modo que el patrón de transmisión es preferentemente endémico en las áreas tropicales mientras que en las zonas con mayor altitud y climas más templados el patrón tiende a ser de tipo epidémico o con brotes esporádicos (Teixeira et al., 2002a).

En las últimas décadas ha habido un giro importante en cuanto a la redistribución de la población con mayor acumulación en los centros urbanos y una consecuente disminución del número de los centros rurales. El crecimiento de los centros urbanos con más de 50 000 habitantes los ha transformado en centros de atracción por ser polos de desarrollo industrial, turístico, comercial, fuentes de empleo y sitios donde se concentran los servicios médicos, de modo que estos centros funcionan como puntos de enlace para el transporte y se constituyen como focos potenciales de dispersión o introducción de la infección. Los centros turísticos son de alta prioridad dada su importancia internacional y económica (Meltzer, Rigau y Clark, 1998). Aquí, uno de los factores que favorece la introducción de individuos infectados es el alto índice de migración nacional e internacional que se genera. La introducción de nuevos serotipos (DEN-3) está muy ligada a este tipo de movimiento poblacional (Castillo, 2000).

El rápido crecimiento y desplazamiento de la población hacia las áreas urbanas no se ha dado acorde con un crecimiento similar de los servicios públicos básicos, en especial de la dotación de agua potable entubada y de la recolección constante de la basura. Como parte del proceso de integración al mundo urbano, la población adopta patrones de consumo de productos no reciclables, con lo que se incrementa la producción de basura y la proliferación de criaderos potenciales como recipientes de vidrio, metal y plástico.

Asimismo, el flujo derivado del turismo, ha jugado un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad (Hundt, 1996). Esta diseminación, se ha debido a que es la época más importante en la que se presenta un alto índice de migración en la historia del hombre; aunado a un nuevo entorno óptimo para la reproducción del vector. Los centros turísticos son de alta prioridad, dada su importancia internacional y económica. Uno de los factores más importantes es el alto índice de migración nacional e internacional que genera la introducción de nuevos serotipos, este tipo de movimiento poblacional se torna relevante para las zonas turísticas del Caribe, por su cercanía y permanente comunicación con otras zonas del continente.

II.7. Cuadro Clínico

El espectro clínico de la enfermedad incluye desde los casos asintomáticos y cuadros febriles inespecíficos hasta la FD, FHD y el SCD. Los casos de FHD y el SCD fueron identificados por primera ocasión en Australia en 1897 y en Grecia en 1928 (Rosen, 1986). El cuadro clínico fue reconocido y estudiado en Manila en 1954 (Monath y Burke, 2001). Esta forma hemorrágica del dengue aparece en brotes o epidemias, sobreimpuestas a situaciones de alta endemia. Se asocia a una respuesta inmune secundaria, sobre todo al serotipo DEN-2, aunque cualquiera de los cuatro serotipos lo puede producir y se localiza en las áreas donde dos o más serotipos se encuentran circulando activamente (Thu et al., 2004).

Se describen a continuación los criterios para definir e identificar las diferentes formas en que se presenta el dengue (Figura 4).

II.7.1. Fiebre por dengue (FD).

Fiebre por dengue: Tiene un inicio repentino con manifestaciones generales semejante a un cuadro gripal, acompañado de fiebre elevada (39.5°C-41°C), artralgias, dolor retroocular característico, mialgias, erupción cutánea, cefalea intensa, enrojecimiento de conjuntivas y que después de una semana, los síntomas ceden pero puede persistir la debilidad. En el cuadro clínico de FD, se pueden observar manifestaciones hemorrágicas de tipo leve como epistaxis, petequias, gingivorragia (sangrado de encías) y menorragias. Este cuadro puede durar de tres a siete días (Martínez, 1995).

Las manifestaciones neurológicas observadas en algunos pacientes con infección con el virus del dengue incluyen signos como somnolencia, confusión mental que puede evolucionar hasta el coma, espasticidad, parálisis y signos extrapiramidales; a ésta sintomatología se la ha definido con el término de encefalopatía por dengue (Bray et al, 1998; Solomon et al., 2000).

En los niños menores de 5 años, puede confundirse con una enfermedad febril exantemática típica de este grupo de edad (Sarampión, Rubéola) por lo que el antecedente de estancia o residencia en áreas endémicas es muy importante (Monath, 1997; Kalayanarooj et al., 1997).

II.7.2. Fiebre Indiferenciada

Cuadro febril indiferenciado: es observado principalmente en niños pequeños, con fiebre de uno a 5 días de duración (Martínez, 1995).

II.7.3. Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD).

Incluye los siguientes criterios: fiebre o antecedente reciente de fiebre, presencia de hemorragia evidenciada al menos por una de las siguientes manifestaciones: la prueba del torniquete positiva, petequias, equimosis, púrpura y/o sangrados de mucosas, del tracto gastrointestinal, sitios de inyecciones u otras, acompañados de trombocitopenia igual o menor a $100\ 000/\text{mm}^3$, señales de extravasación de plasma y de incremento en la permeabilidad vascular (derrame pleural, ascitis, hipoproteinemia). La hemoconcentración se mide por el incremento en el hematocrito de 20% por encima del promedio para esa edad y población, o su disminución en 20%, después del tratamiento. La FHD se presenta alrededor del cuarto y quinto días, cuando la fiebre desaparece y se intensifican el dolor abdominal y el vómito, como signos de alerta. En ese momento se presentan los sangrados más profusos, pueden presentarse los derrames serosos o instalarse el choque. Aunque el cuadro de FHD generalmente es de aparición rápida, por lo regular se autolimita en 24 a 48 horas. La postración por debilidad es extrema y la hipotensión ortostática puede ser la causa de lipotimias. Otros datos que suelen acompañar al cuadro de FHD son: derrame pleural derecho o bilateral, dolor en área hepática y/o abdominal intenso, hepato y esplenomegalia, y ascitis. (Marianneau et al., 1998; Setiawan, 1998). Durante el cuadro pueden presentarse complicaciones graves como choque e insuficiencia hepática y renal (Nguyen TL, Nguyen TH y Tieu NT, 1997).

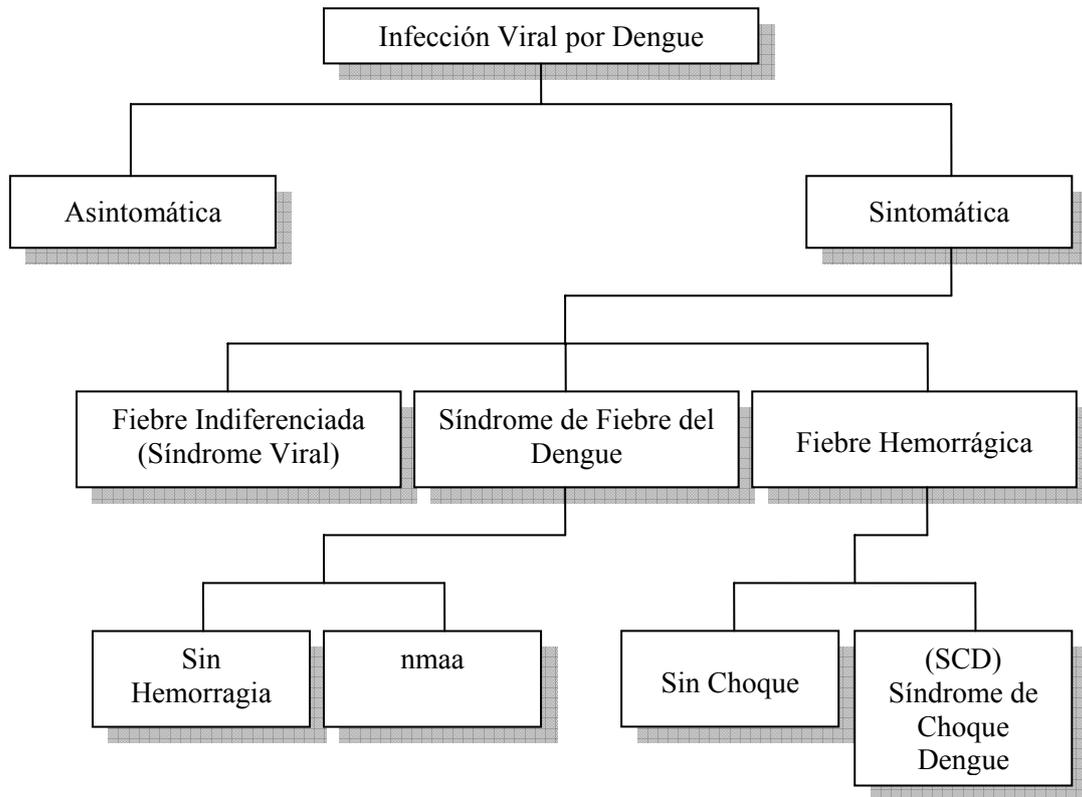


Figura 4. Manifestaciones del síndrome del dengue

Asimismo, la OMS ha simplificado la clasificación de la FHD en grados, según su gravedad, como puede observarse a continuación:

Tabla 2. Dengue Hemorrágico

| | |
|-----------|---|
| Grado I | Fiebre acompañada de síntomas generales no específicos, prueba del torniquete positiva, trombocitopenia y hemoconcentración. |
| Grado II | Las manifestaciones del grado I más la presencia de hemorragias espontáneas. |
| Grado III | Insuficiencia circulatoria que se manifiesta por pulso rápido y débil, disminución del intervalo de la presión diastólica/sistólica a menos de 20 mm Hg, hipotensión, piel húmeda y fría, cianosis e inquietud. |
| Grado IV | Estado de choque profundo con presión sanguínea y pulso imperceptibles. |

OPS,1995. Publicación científica No. 548.

II.7.4. Definición de Síndrome de Choque por Dengue (SCD)

Incluye los criterios de la FHD más la presencia de hipotensión arterial, pulso rápido y débil, extremidades frías y estrechamiento de la presión arterial con un diferencial igual o menor a 20 mm Hg., es la forma más severa de la enfermedad, se caracteriza por postración e irritabilidad, choque con extremidades frías por insuficiencia vascular periférica.

El SCD suele ser el desenlace de la FHD y se caracteriza por hipovolemia secundaria a extravasación de plasma al espacio extravascular. Sus signos prominentes son la hipotensión y el pulso filiforme. Los datos clínicos de alarma que anuncian el estado de choque son: el paso rápido de hipertermia a hipotermia, el vómito incoercible, el dolor abdominal intenso y mantenido - signos que anteceden a los sangrados masivos - y las alteraciones de conciencia. Además, se presentan las manifestaciones de insuficiencia circulatoria: piel fría, cianosis peribucal o de las extremidades, llenado capilar lento, taquicardia, tensión arterial disminuida o imperceptible; o bien, reducción de la tensión diferencial (sistólica/diastólica) a menos de 20 mm Hg, pulso rápido, débil o imperceptible, oliguria, y alteraciones en el estado de conciencia como agitación, letargo o confusión. (Janssen et al., 1998; Vasconcelos et al., 1998).

Si el cuadro se prolonga más de 12 a 24 horas y no se corrige en forma oportuna, puede conducir a acidosis metabólica, sangrados severos, falla orgánica múltiple y coagulación intravascular diseminada. La muerte o recuperación ocurren por lo regular en un lapso

de 24 a 48 horas, por lo que el manejo durante esta fase es crítico para el pronóstico del paciente.

II.8. Diagnóstico

La FD y la FHD han aumentado en frecuencia y distribución geográfica, y esta debe ser del conocimiento de los médicos generales, pediatras, médicos en servicio de urgencias y los médicos del sector privado localizados en las principales áreas de transmisión, ya que el diagnóstico de dengue y sus formas severas debe basarse en los antecedentes epidemiológicos y la información clínica.

El diagnóstico por laboratorio, tiene utilidad para confirmar el diagnóstico clínico, evaluar los niveles de la transmisión y detectar los cuadros severos de manera oportuna. Existe una variedad de técnicas de laboratorio desarrolladas para el diagnóstico de la infección por los virus dengue y cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas. Una condición importante para el uso óptimo de estas pruebas es el conocimiento de la respuesta inmune y los momentos adecuados de la toma de la muestra para el uso de cada técnica en particular. El aislamiento del virus sólo es posible durante la etapa aguda de la enfermedad cuando la viremia se encuentra en su fase más elevada (primeros cinco días). Para la identificación del aumento de los anticuerpos entre la fase aguda y convaleciente existen diversas técnicas para detectar los anticuerpos IgM e IgG que inclusive pueden diferenciar si las infecciones son primarias o secundarias. Recientemente se dio a conocer que la detección de anticuerpos IgA en el suero puede ser relevante en el diagnóstico de la infección por dengue (Groen et al., 1999; Guzmán et al, 2003b).

II.8.1. Aislamiento del virus

Los primeros aislamientos virales, en la década de 1940, se realizaron por medio de la inoculación intracerebral en ratones lactantes. Para el aislamiento viral, la muestra ideal es el suero, también se han utilizado homogeneizados de tejidos como: hígado, bazo, ganglios linfáticos, procedentes de casos fatales. Los virus dengue también se replican en células de mamífero en las que se identifica el daño citopático después de la infección. Sin embargo la baja sensibilidad de estas células impide su uso en la actualidad.

Los cultivos de células de líneas de mamíferos como Vero (riñón de mono), BHK-21 (riñón de hámster) LLCMK2 (riñón de mono verde africano) son sensibles y de gran

utilidad para el aislamiento viral (Guzmán y Kourí, 1996), aunque son menos sensibles que las células de mosquitos.

En las últimas décadas se han desarrollado una serie de líneas celulares de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus, dentro de las más utilizadas se encuentran las células AP-61 (*Aedes pseudocutellaris*), C6/36 (*Aedes albopictus*), TRA-284 (*Toxorhynchites anboinensis*) y C6/36 HT; la sublínea celular C6/36 HT está adaptada a crecer a 33°C y exhiben el mismo efecto citopático que las C6/36 originales, mostrándolo más rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28°C (Rodríguez et al., 2000). La elevada sensibilidad de estos sistemas ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento (Burke, Nisalak, Johnson, 2001).

El uso de la técnica de transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha permitido detectar al genoma del virus en suero de pacientes (Harris et al., 1998; Vaughan et al., 1999). Este procedimiento es sensible, específico y rápido ya que permite obtener resultados en ocho horas, a diferencia del aislamiento viral en cultivo de células que por lo regular requiere alrededor de dos semanas. La técnica de RT-PCR tiene la ventaja de detectar el genoma del virus aun cuando éste no sea infeccioso o bien se encuentre en el suero en forma de complejo unido a anticuerpos, permitiendo el diagnóstico rápido serotipo-específico (Rosario et al., 1998; Sudiro, Zivny, Ishiko, 2001).

También se han utilizado sondas de hibridación específicas no radiactivas (marcadas con un complejo de biotina-fluoresceína) para identificar al virus directamente, a partir de una muestra sanguínea (Ruiz, Zamora, Liu, 1995).

II.8.2. Diagnóstico Serológico

Las pruebas serológicas clásicas son la IH, la fijación de complemento (FC) y la neutralización (NT) (Clark y Cassals, 1958; Casey, 1965; Russell et al., 1967). El diagnóstico serológico depende del aumento en el título de anticuerpos durante la fase aguda y convaleciente. Las reacciones cruzadas con otras arbovirosis como la fiebre amarilla y la encefalitis de San Luis, en cierta manera limitan el uso de las técnicas de ELISA en los lugares donde existe transmisión simultánea de estas enfermedades. La fijación de complemento (FC) y la neutralización son serotipo específicas y no tienen el problema que la IH, sin embargo son más costosas (Balmaceda, 2002; Guzmán, 2004; Palmer y Whales, 1986).

También existen técnicas rápidas como el ELISA para determinar anticuerpos IgM e IgG contra el virus dengue (Cuzzubbo et al., 1999; Nawa et al., 2001; Cuzzubbo, Vaughn, Nisalak, 2000). Estas técnicas son de enorme utilidad para la vigilancia epidemiológica ya que permiten confirmar la transmisión de virus dengue, conocer la prevalencia de infección y son fáciles de adaptar a los laboratorios locales a más bajos costos (Sang, Cuzzubbo, Devine, 1998; Chakravarti et al., 2000). La prueba de MAC-ELISA para IgM tiene la ventaja de usar antígenos relativamente crudos y que la automatización del proceso permita analizar varias muestras a la vez (WHO, 1997). La sensibilidad con muestras de suero de convalecientes se encuentra entre 90 y 97 % y el número de falsos positivos es menor a 2 % (Tan et al., 1994). En la infección primaria por cualquier virus del complejo dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que las muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del quinto día de establecida la enfermedad. Si las muestras son tomadas y manejadas adecuadamente, la prueba permite: A) establecer el diagnóstico de infección reciente por virus dengue; B) estimar si se trata de una infección primaria o secundaria; y C) realizar estudios de prevalencia de la infección.

Las IgG tienen un comportamiento diferente: en la primo-infección se desarrollan de manera relativamente lenta a partir de la primera semana del cuadro clínico alcanzando su pico máximo en tres a cuatro semanas; durante una infección secundaria la respuesta (memoria inmunológica) es más rápida, más intensa y más prolongada, con valores superiores a 1:1280 en los primeros 2 o 3 días. De las técnicas empleadas un diagnóstico serológico correcto depende de un aumento significativo (4 veces o más) del título de anticuerpos específicos entre el suero tomado en la fase aguda y el tomado en la fase convaleciente de la enfermedad (Lam y Devine, 1998; Sang, Cuzzubbo, Devine, 1998). Otras técnicas disponibles son la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF) que es muy laboriosa y las pruebas de Dot-blot que son simples, rápidas, accesibles a laboratorios periféricos aunque su costo es más elevado al realizarse cada prueba de manera individual. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas se encuentra en el nivel de 90 a 100 % dependiendo de la firma comercial (Kuno et al., 1998; Wu et al., 1997).

II.9. Tratamiento

El tratamiento del dengue clásico es sintomático con el uso de antipiréticos excepto de ácido acetilsalicílico, el cual está contraindicado por sus propiedades antiplaquetarias y el posible daño a la mucosa gástrica. Lo que justifica el empleo de medicamentos tipo antiinflamatorios no esteroideos o analgésicos-antipiréticos en los pacientes con dengue es, generalmente, la incapacidad o molestia general que representan la cefalea, mialgias, artralgias y la fiebre elevada. No obstante, en estos pacientes también se tiene el riesgo constante de sangrado de mucosas, principalmente de tracto digestivo. Se considera que el medicamento de primera elección, tanto en pacientes pediátricos como adultos, es el paracetamol aplicado por vía rectal, con el fin de evitar la auto-sobredosificación que, como se sabe, es la principal causa de presencia de efectos colaterales. En caso no ser posible esta vía se recomienda la oral y como segunda opción, se recomienda administrar metamizol (dipirona), principalmente en aquellos casos en que no exista una respuesta antipirética o analgésica adecuada al paracetamol (OPS, 1995).

El tratamiento de DH debe realizarse a nivel hospitalario, para promover la adecuada oxigenación del paciente, monitorear constantemente el nivel de plaquetas, la hemoconcentración y la presión arterial. Si el sangrado es abundante y las plaquetas bajas, debe considerarse la administración de plaquetas y/o sangre fresca dependiendo de las cifras de trombocitos. La administración de líquidos por vía intravenosa debe ser oportuna para mejorar las condiciones hemodinámicas del paciente, pero cautelosa para evitar el edema pulmonar por una carga innecesaria una vez que retorne el líquido del espacio extravascular. El uso de corticoides y el de heparina no cuentan con estudios concluyentes que demuestren su utilidad en el caso del FHD/SCD. No existe indicación alguna para el empleo de esteroideos ya que no se trata de daño vascular estructural, además de que tiene efecto inmunosupresor y, por otro lado, se sabe que la causa de la trombocitopenia no es de naturaleza autoinmune.

Es necesario un manejo eficiente y oportuno para evitar complicaciones o resolverlas en forma, eficaz, buscando que se gaste el mínimo indispensable de recursos y que se acompañe del menor porcentaje posible de complicaciones. En el caso de la FHD este manejo se denomina “fisiológico intensivo”, ya que es una enfermedad que el mismo organismo es capaz de resolver mediante otros mecanismos de compensación propios. El mejor manejo de reposición hidroelectrolítica del lecho intravascular se hará con reposición oral y en cuadros de mayor severidad por vía intravenosa a base de soluciones cristaloides. Esta reposición debe ser moderada y cuidadosa, tratando de

mantener estables las constantes vitales ya que existe el peligro de que en el momento de recuperación, la redistribución de los fluidos y coloides corporales del espacio intersticial al intravascular genere estados nosológicos que pongan en peligro la vida del paciente, por ejemplo edema pulmonar. Queda proscrito totalmente el uso de expansores del plasma tipo dextrán y de ácido acetil salicílico, por su efecto deletéreo sobre el funcionamiento plaquetario (Suchitra, 2001).

II.10. Prevención y control

De todas las enfermedades arbovirales, el dengue representa la más frustrante porque aunque es aparentemente vulnerable a métodos simples de control, la enfermedad ha resurgido mundialmente. Existen diferentes tipos de control empleados actualmente en el mundo principalmente el control químico y el biológico.

En diversos países los programas de control del mosquito han sido inadecuados y en otros interrumpidos y lo único que provocaron fue: un gasto económico fuerte, una rápida reinfestación del vector, resistencia a insecticidas por parte del vector, un descontrol biológico para otros organismos que también son dañados por los insecticidas usados y por último métodos inadecuados de dispersión de los insecticidas usados.

Debido a que no se ha encontrado hasta el momento un método de control satisfactorio para esta enfermedad es necesario buscar otras estrategias para combatirla.

Una alternativa para el control del dengue y sus cuadros severos es el uso de vacunas que confieran protección contra los cuatro serotipos del dengue, sin embargo, ninguna vacuna se encuentra disponible para uso masivo. Entre las dificultades para desarrollar vacunas contra el virus dengue está la necesidad de lograr inmunidad protectora y de larga duración a los 4 virus y la no existencia de un modelo animal que reproduzca la enfermedad.

Las nuevas técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo acelerado de nuevas vacunas para enfermedades infecciosas de relevancia mundial. El dengue se encuentra entre ese grupo de infecciones con urgencia para contar con una vacuna segura, inmunogénica, práctica y de bajo costo. Los diferentes abordajes utilizados – atenuación o manipulación genética- empiezan a rendir sus primeros frutos.

Las vacunas vivas atenuadas proporcionan inmunidad prolongada, pueden ocasionar efectos secundarios e inclusive corren el riesgo de revertirse a las formas virulentas. Sin embargo, la vacunación con una vacuna viva atenuada, segura, sigue siendo el

mecanismo ideal para la protección de la infección debido a los niveles de protección que generan y al amplio repertorio de antígenos involucrados en la génesis de la respuesta inmune.

Actualmente hay varios grupos trabajando en el desarrollo de una vacuna tetravalente atenuada (Guirakhoo et al., 2000; Kanesa-Thasan et al., 2001) y el grupo del doctor Blaney tiene buenos progresos en el desarrollo de una vacuna tetravalente mutante en NS3 atenuado de DEN-4 y virus quiméricos antigénicos que expresan proteínas estructurales (Durbin et al., 2002) pero esto llevará tiempo antes de que se tenga una vacuna con licencia para ser usada en humanos.

A pesar de realizar grandes esfuerzos, los países del Caribe, América Central y del Sur se han reinfestado de tal manera que actualmente la población del mosquito presenta una distribución geográfica similar a la que existía previa a la campaña de erradicación; debido principalmente a fallos en el soporte político y financiero (Clark, 1995). En la emergencia del control del vector, múltiples son los factores que se necesitan tener en cuenta: como la dinámica de población del vector y de la epidemiología de la enfermedad son primordiales. Se hacen necesarios insecticidas residuales más eficientes, estimar mejor la densidad del vector y el umbral de transmisión. También es necesario conocer mejor sobre los períodos interepidémicos y los factores que influyen en la transmisión epidémica, por lo que es importante conocer el papel que juegan la dispersión del mosquito y los movimientos humanos en este evento. Desde el punto de vista operacional es importante la educación y motivación de la comunidad, siendo necesario lograr métodos de vigilancia del vector adulto que sean prácticos y realizables (Focks et al, 2000).

Es cierto que el control del vector del dengue jamás será a un bajo costo, aún cuando la comunidad asumiera la mayor parte de la responsabilidad en el problema, es necesario el soporte financiero a través del gobierno, con personal altamente calificado para el control, apoyado en una estructura organizativa sólida. Esto podría considerarse muy difícil de alcanzar, pero si se analiza el alto costo de epidemias de FHD en los aspectos de tratamiento médico, ausentismo laboral, impacto en el turismo y mortalidad, el beneficio de una prevención efectiva es inaplazable (Reiter y Gubler, 1997; Focks et al.,2000).

Capítulo III. Materiales y Métodos

III.1 Incidencia de casos de dengue en el Estado de Campeche, México, de 1990-2005.

III.1.1. Tipo de Estudio.

Estudio de tipo retrospectivo, porque permitió utilizar información de años anteriores y consecuentemente inferir comportamientos futuros de la enfermedad.

III.1.2. Recopilación de información.

Se realizó una revisión exhaustiva de los archivos de la Secretaría de Salud del Estado, de todos los casos de dengue registrados por mes, en un período de dieciséis años (1990-2005). Al principio de la década de los 90, el estado de Campeche no contaba con laboratorios especializados para el diagnóstico del dengue, por lo que las muestras que se obtenían de casos probables eran enviadas al Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (I.N.D.R.E.), en donde se realizaba la técnica de ELISA de Captura (MAC-ELISA) de IgM y para el aislamiento, el cultivo viral en células Vero y, posteriormente, la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la identificación del serotipo.

Se consideró “caso sospechoso” a todo paciente febril con dos o más síntomas sugestivos de FD, presencia en la misma localidad y en el mismo período de otros casos confirmados de dengue y cuyo diagnóstico no fue confirmado por laboratorio. Y “caso confirmado de dengue” a todos aquellos pacientes en los que por serología y/o aislamiento viral se confirmó el diagnóstico. Por lo que para los resultados de este objetivo solamente se consideraron los casos confirmados.

III.1.3. Incidencia de casos (confirmados) de fiebre de dengue.

Se obtuvo la Incidencia de casos de FD de cada uno de los municipios que conforman el Estado de Campeche, de los dieciséis años revisados. Es importante aclarar que para el año de 1995 el estado solamente tenía 9 Municipios; en el año 1996 se funda como un nuevo municipio Calakmul, por lo que los casos detectados en esta región en años anteriores están reportados en el municipio de Champotón. Aconteciendo lo mismo para el municipio de Candelaria en el año de 1997, por lo que todos los casos de dengue

detectados en este municipio hasta el año 1996, están reportados en el municipio de Carmen.

Definiendo que incidencia, son los casos nuevos de la enfermedad que se producen en una población durante un intervalo de tiempo.

Todos los casos reportados fueron procesados por serología y /o aislamiento viral en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE).

III.1.4. Incidencia de casos de Fiebre Hemorrágica del Dengue.

Se obtuvo la Incidencia de casos de FHD por municipio de los dieciséis años analizados, confirmados por clínica: fiebre elevada continua de dos a siete días de duración, manifestaciones hemorrágicas como prueba del torniquete positiva y cualquiera de los siguientes signos clínicos: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, hemorragia gingival, hematemesis o melena. Y datos de laboratorio trombocitopenia ($100\ 000/\text{mm}^3$ o menos); hemoconcentración, elevación del hematocrito en un 20 % o más según criterios establecidos por la OMS (WHO, 1997).

El calculo de la tasa de casos de dengue clásico y hemorrágico en los dieciséis años estudiados se obtuvo mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Tasa} = \frac{\text{Número de Casos}}{\text{No. de habitantes}} \times 100\ 000$$

III.2. Estudio seroepidemiológico a virus dengue en escolares de la Ciudad de Campeche, en el año de 1994.

III.2.1. Tipo de Estudio.

Estudio de tipo prospectivo de cohorte en el que se aplicó para el análisis de resultados el riesgo relativo, que nos permitió identificar la asociación entre la exposición a la lluvia y la presencia del dengue.

III.2.2. Universo de estudio.

Se seleccionaron al azar 5 colonias (Barrios de aproximadamente 5561 habitantes del total de 40) de la Ciudad de Campeche, en las que se ubicaron centros escolares de donde se obtuvieron las muestras.

El universo de estudio estuvo constituido por escolares de 7 a 14 años de edad, y el motivo por el que fueron seleccionados escolares para este estudio, fue que los consideramos como una “población cautiva” para poder realizarles las dos tomas de muestras sanguíneas, ya que se les pudo encontrar durante el período de dos cursos escolares.

Cálculo del tamaño de la muestra: el tamaño del universo fue de 4378 (número total de escolares que cursaban el cuarto y quinto año de primaria en la ciudad de Campeche); mediante la fórmula establecida para la estimación de proporciones se calculó el tamaño de la muestra (Downie y Heath, 1982), resultando un tamaño de muestra ajustada de 353 para un 95 % de confianza.

III.2.3. Encuesta.

Se realizó una encuesta clínico-epidemiológica a cada uno de los niños, en la cual se recogieron los siguientes datos:

ENCUESTA CLINICA EPIDEMIOLOGICA

DENGUE.

DATOS DE LA PERSONA:

Nombre: _____
Edad: _____ años. Sexo: _____
Domicilio: _____ Colonia: _____
Municipio: _____ Estado: _____

CARACTERÍSTICAS DE LA HABITACIÓN:

- () Circular 1 habitación () Más de 1 habitación.
() Paredes de Madera () de piedra () de block
() Piso de tierra () de cemento () de mosaico
() Techo de Palma () de lámina () de teja () de concreto

ABASTECIMIENTO DE AGUA:

- () Intradomiciliaria entubada () Intradomiciliaria entubada
() Extradomiciliaria pozo común () Extradomiciliaria corriente natural

DEPOSICIÓN DE EXCRETAS:

- () wc () letrinas () defecación al aire libre

CONDICIONES DEL LUGAR:

- () Aguas estancadas () Presencia de mosquitos () Acúmulo de basura
() almacena agua ¿En qué recipientes?: _____

DATOS CLÍNICOS:

- () dolor retrocular () fiebre () cefalea () dolores óseos
() escalofríos () erupción cutánea () epistaxis () gingivorragia
() Hematemesis () vómitos () mialgias () Ictericia
() Dolor abdominal

ANTECEDENTES DE VIAJES RECIENTES: _____

OBSERVACIONES: _____

RESULTADOS DE LABORATORIO:

ELISA: _____ IHA: _____ SEROTIPO: _____

FECHA: _____

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

No.

Fecha: _____

Los padres ó tutores declaramos libre y voluntariamente, que aceptamos que nuestro hijo participe en el “estudio seroepidemiológico de virus dengue en escolares de la Ciudad de Campeche, en el año de 1994”.

Estamos conscientes de que los procedimientos, consistirán en la toma de 3.0 ml de sangre a nuestro hijo y a responder una encuesta para completar la información del estudio.

Somos conscientes de los beneficios que aportará este estudio y en caso que decidiéramos retirar a nuestro hijo del mismo, lo podremos hacer en el momento que así lo deseemos.

Nombre de la madre: _____

Firma: _____

Nombre del padre: _____

Firma: _____

III.2.4. Obtención de muestras.

Previo impartición de charlas y consentimiento de los padres de familia (se anexa hoja de consentimiento informado), se obtuvieron por punción venosa dos muestras de sangre, una durante los meses de marzo y abril (no periodo de lluvia) y la segunda se obtuvo, durante los meses de octubre y noviembre (período de lluvia). Una vez obtenidas las muestras, se separó el coágulo y los sueros fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

III.2.5. ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM a dengue (MAC-ELISA).

Se empleó el método propuesto por Kuno (1991). A placas de poliestireno de 96 pozos (IMMULON) se le agregó 100µL por pozo de inmunoglobulinas anti-IgM humanas (Laboratorios Kirkegaard & Perry preparado en carnero) a una concentración de 5µg/mL en buffer de carbonato-bicarbonato, 0.05M, pH 9.6, y fueron incubadas a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se lavaron las placas, 5 veces, en buffer fosfato-salina (PBS) pH 7.2 y se bloqueó la placa con seroalbúmina bovina (SAB Fracción V SIGMA) al 4% a 150 µL por pozo durante una hora a 37°C. Se lavaron 5 veces en PBS y se agregaron los sueros diluidos 1/40 en PBS-SAB al 0.5% a 50µL por pozo y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Se incluyeron sueros positivos y negativos como controles, también a una dilución 1/40. Después de lavar 5 veces se añadió una mezcla de antígenos de los 4 serotipos a 16 UH de cada uno (Instituto Pedro Kourí), 50µL por pozo diluido en PBS-SAB al 0.5% y se mantuvieron las placas a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 5 veces y se añadió el monoclonal 6B6C-1 conjugado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/6000 en PBS-SAB al 0.5%, 25µL por pozo durante 60 minutos a 37°C, se lavaron 7 veces en PBS y se añadió el sustrato constituido por Solución A (2,2-azino-di 3-ethyl-benzythiazoline sulfonate) y Solución B (Peróxido de Hidrógeno H₂O₂) (Laboratorios Kirkegaard & Perry) 100 µL por pozo a 37°C durante 30 minutos, se dejó a temperatura ambiente 2 horas y se realizó la lectura en un lector de ELISA a 410 nm.

Se consideraron positivos todos aquellos sueros que dieron una lectura mayor o igual a 0.200.

III.2.6. Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

A cada suero se le determinó el título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH). La Cepa Nueva Guinea C del serotipo 2 fue utilizada como antígeno. Todos los sueros fueron corridos en diluciones al doble desde 1/10 y hasta título final igual a 1:2560. La mayor dilución del suero donde se observó un patrón de inhibición total de la hemaglutinación fue considerada como su título de anticuerpos IH (Clarke y Cassals, 1958).

Controles Positivos: Pool de sueros humanos con títulos de anticuerpos IH mayor de 1/2560.

Controles Negativos: Pool de sueros con título de anticuerpos IH menor de 1/10, obtenidos de individuos de áreas no endémicas y con ausencia de anticuerpos a flavivirus.

Obtención y tratamiento con los eritrocitos de ganso.

Por punción venosa del ala de ganso macho, se obtuvieron los eritrocitos y se resuspendieron en 2mL de Asever (anticoagulante), se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron tres veces con Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV) se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en solución de DGV y se guardaron a 4°C. Posteriormente se realizó una dilución 1/24 con el amortiguador de pH 9.4 apropiado (debido a que la hemaglutinación es dependiente del pH) dando una lectura de 0.75 de DO en un espectrofotómetro a 490 nm.

Fórmula para ajustar la DO de los eritrocitos:

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{Volumen inicial} \times \text{DO observada}}{\text{DO deseada}}$$

Tratamiento de los sueros con Kaolín.

El Kaolín se utilizó para eliminar los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación que puedan estar presentes en los sueros humanos (Clarke y Cassals, 1958; García y cols., 1997). Se añadieron 100µl de suero, 400µl de solución buffer borato salina pH 9.0 y 500µl de la suspensión de Kaolín, se agitó la mezcla en un vórtex durante 20 minutos

a temperatura ambiente y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos, quedando el suero diluido 1:10

Adsorción de aglutininas.

Para eliminar las aglutininas inespecíficas se absorbieron los sueros ya tratados con eritrocitos de ganso de la siguiente manera: A las diluciones de los sueros tratados con Kaolín se les añadió 10µl del paquete de eritrocitos de ganso y se agitó suavemente, se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos con agitación ocasional (tiempo en el cual ocurre la adsorción), se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Titulación del Antígeno.

Para la titulación del antígeno se hicieron diluciones al doble en placas de microtitulación a diferentes pH. Para determinar el título hemaglutinante y el pH óptimo, se consideró como punto final la más alta dilución de antígeno que mostró aglutinación completa (título del antígeno). El pH óptimo se consideró aquel donde el título de antígeno fue mayor. Para la IH se utilizó una dilución de antígeno que contuviera de 4 a 8 unidades hemaglutinantes por 0.025mL

Inhibición de la hemaglutinación.

Se colocaron los sueros en placas con fondo en U y se realizaron las diluciones de los mismos desde 1/10 hasta 1/2560 con pipeta multicanal, se añadió 0.025mL de la dilución de antígeno que contenía 4-8 unidades hemaglutinantes, se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos, posteriormente se añadieron 0.05mL de glóbulos rojos, se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente.

Para la interpretación de los resultados, se emplearon los siguientes criterios establecidos por la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, 1980; OPS, 1994).

Negativos: Se consideraron negativos aquellos sueros que presentaron títulos de anticuerpos IH menor de 1/20.

Positivos: Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron títulos de anticuerpos IH igual o mayor de 1/20.

Caso confirmado de infección: Se consideraron todos aquellos casos en cuyo suero se detectaron títulos elevados de anticuerpos IH mayor o igual a 1/1280.

Infección secundaria: Los sueros que presentaron títulos de anticuerpos IH mayores o iguales a 1/2560.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se aplicó el método estadístico de comparación de proporciones por la distribución binomial (Daniel, 1999).

III.3. Estudio de un brote de dengue en un área rural del Estado de Campeche en el año 1997.

A principios del mes de octubre de 1997 se produjo un brote de FD/FHD que concluyó en el mes de diciembre del mismo año.

III.3.1. Área del estudio.

El ejido (Poblaciones pequeñas de entre 10 a 200 habitantes en áreas rurales) “La Lucha” perteneciente al Municipio de Calakmul, área enclavada en una zona selvática del estado de Campeche, se localiza entre las coordenadas geográficas extremas de los paralelos 19° 12’ y 17° 48’ de latitud norte, así como los meridianos 89° 09’ y 90° 29’ de longitud oeste de Greenwich. Este Municipio colinda al norte con el Municipio de Hopelchén, al sur con la República de Guatemala, al este con el Estado de Quintana Roo y Belice y al Oeste con los Municipios de Carmen y Escárcega.

En la Figura 5 se presenta el procedimiento utilizado para el estudio de este brote.

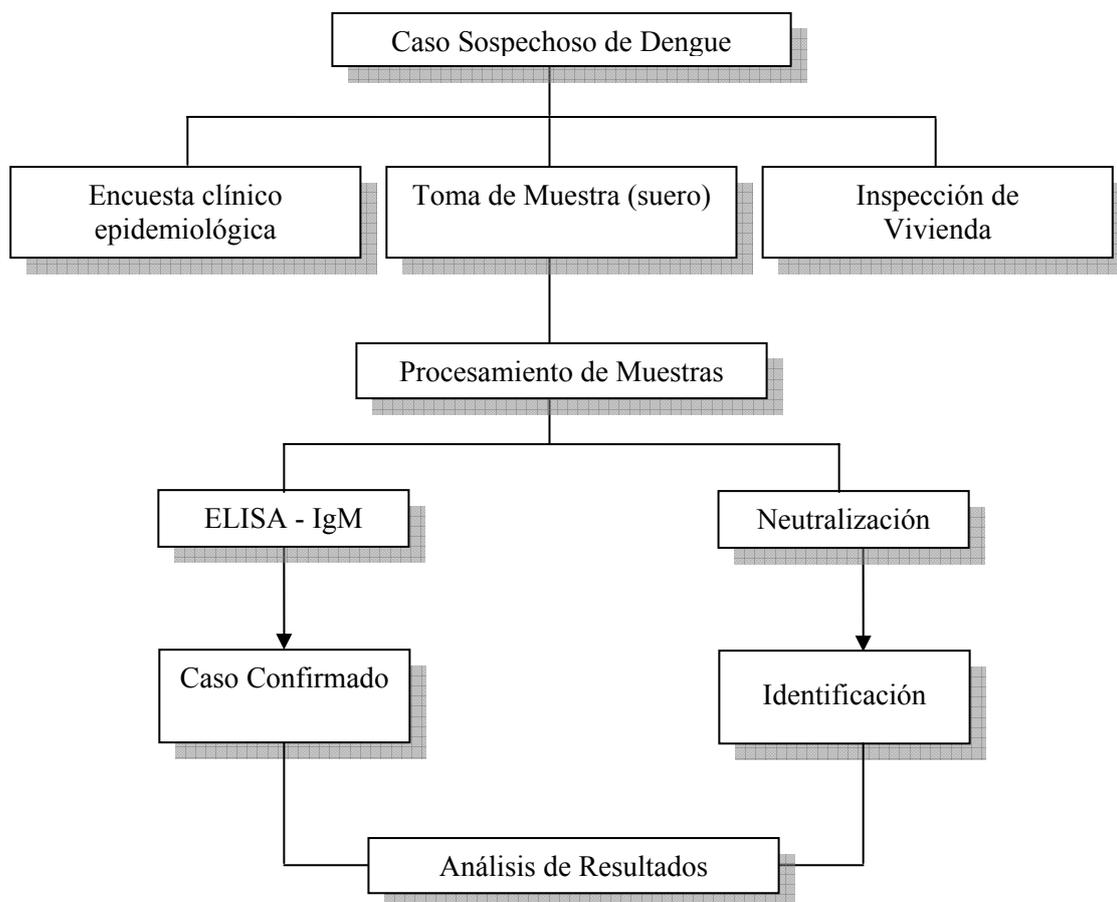


Figura 5. Diagrama de flujo

III.3.2. Muestreo y recolección de datos.

Se realizó un estudio descriptivo de los 61 casos clínicamente sospechosos de presentar dengue.

Caso sospechoso: Se consideró a todo aquel paciente que además de presentar un cuadro febril agudo, presentaba dos o más síntomas sugestivos de FD, como mialgias y artralgias, cefalea y dolor retroorbital, acompañado o no de erupción cutánea y alguna manifestación hemorrágica.

Caso confirmado: Todo caso confirmado por el laboratorio de virología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, mediante la prueba de ELISA de captura de IgM a virus dengue.

III.3.3. Toma de muestra.

Previo consentimiento del paciente (se anexa hoja de consentimiento informado) se tomó una muestra sanguínea por punción venosa de aproximadamente 5mL. Posteriormente fueron transportadas en frío al laboratorio y una vez separado el suero, estos fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

Todas estas muestras fueron obtenidas dentro de los primeros 5 a 10 días de haberse iniciado la fiebre.

III.3.4. ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA).

Se empleó el procedimiento descrito en el acápite III.2.5.

III.3.5. Neutralización.

Se aplicó la técnica de Neutralización por reducción del número de placas, con el objeto de conocer los serotipos circulantes en esta región. Esta técnica es ampliamente recomendada por su alta sensibilidad y especificidad (Morens et al., 1985; Alvarez et al., 2005).

III.3.6. Cepas virales.

En la tabla 3 se presentan las cepas empleadas en el estudio de neutralización.

Preparación de los lotes virales para la neutralización.

Se inocularon frascos plásticos de 25 cm² con monocapas confluentes de células C6/36 HT con 500 µL de la dilución de virus a una multiplicidad de infección 0.001, empleando medio de mantenimiento. Se incubaron una hora a 33°C. Posteriormente se añadieron 5 mL de medio de mantenimiento MEM con aminoácidos no esenciales, 2% de suero fetal bovino inactivado y 0.1% de antibiótico a cada uno de los frascos. Se incubaron nuevamente las células y se observaron diariamente hasta efecto citopático (ECP) en toda la monocapa. El sobrenadante de los cultivos infectados se congeló a -70°C previa adición de suero fetal bovino (SFB) al 2%. Finalmente fue descongelado de forma rápida a 37°C y distribuido en alícuotas de 200µL. El título viral se determinó mediante la técnica de titulación viral por placas, empleando células BHK-21 clono 15.

Tabla 3. Cepas utilizadas en la técnica de Neutralización

| Serotipos | Cepa | Año | # de pases | Procedencia |
|------------------|-------------|------------|---------------------------|----------------------|
| DEN-1 | Angola | 1998 | 4P C6/36 2P Vero 1P C6/36 | Angola |
| DEN-2 | A15 | 1981 | 4P Raton 4P C6/36 | Cuba |
| DEN-3 | 116 | 2000 | 3P C6/36 | Cuba |
| DEN-4 | Dominica | 1981 | 1P C6/36 4P C6/36 HT | República Dominicana |

Titulación viral.

Diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} del virus se prepararon en medio de mantenimiento. 500 μ L de cada una de las diluciones virales se inocularon por triplicado en 500 μ L de células BHK-21 clono 15 a una concentración de 2×10^5 células/mL, previamente colocadas en las placas plásticas estériles de 24 pozos. Las células inoculadas se incubaron durante 4 horas a 37°C en ambiente de CO₂ a 5%. Por cada pozo se adicionaron 500 μ L de medio de recubrimiento. Se incubaron nuevamente durante cinco días para el DEN-2, seis días para el DEN-4, ocho días para el DEN-3 y nueve días para el DEN-1 a 37°C en atmósfera de CO₂ a 5%; posteriormente se descartó el medio y se lavaron gentilmente las monocapas celulares con agua corriente. A cada pozo de la placa le fue añadido 500 μ L de colorante Naphtol Blue Black a una concentración de 0.1% y se esperaron 30 minutos para hacer un nuevo lavado. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

El título viral se determinó (Morens et al., 1985) según la relación:

$$\text{Título} = X / N \times D = \text{ufp/mL (unidades formadoras de placas por mililitro)}$$

En la cual:

X es el promedio del número de placas de la dilución viral.

N es el volumen del inóculo viral (mL).

D es la dilución a la cual se contaron las placas virales.

Neutralización por reducción del número de placas.

Los sueros fueron tratados con cloroformo para su esterilización y posteriormente diluidos 1/30 en medio de mantenimiento. Se incluyeron controles positivo y negativo a igual dilución. Las cepas virales se prepararon a una dilución que contenía 40

ufp/100µL. Cada suero y los controles se mezclaron con igual volumen de dilución de cada cepa viral. Se incluyó además el control de cada virus. Las mezclas se incubaron durante una hora a 37°C en ambiente de CO₂ a 5 %. Posteriormente 50µL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles virales fueron inoculadas en 500µL de suspensión de células BHK-21 clono 15 sembradas en placas de 24 pozos a una concentración de 2x10⁵ células/mL. Se incubaron durante 4 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ a 5%. Después de este tiempo se añadió medio de recubrimiento u overlay (suero de ternera fetal inactivado 10 ml, L-Glutamina 2 mM-1 ml, 2XMEM sin rojo fenol 100 ml, Carboximetilcelulosa al 3 % 50 ml, Antibiótico 0.2 ml) a razón de 500 µL por pozo y las células fueron incubadas durante el tiempo correspondiente para cada cepa como se señaló anteriormente. El procedimiento de tinción se realizó de forma similar al descrito en el acápite de titulación viral (III.4.6.).

El valor porcentual de reducción del número de placas con respecto al control viral se calculó según la relación:

$$\% \text{ de reducción} = 1 - (X_s/X_m) \times 100\%$$

En la cual:

X_s es el promedio del número de placas obtenido para cada dilución del suero.

X_m es el promedio del número de placas obtenido para el control viral.

Criterio de positividad: Todo suero que presentó un por ciento de reducción del número de placas de 50 ó más fue considerado positivo (Sangkawibha et al., 1984; Guzman et al., 2000).

III.4. Estudiar la transmisión de virus dengue en febriles de etiología no precisada en el Municipio de Campeche durante los años 1999 y 2000.

III.4.1.Ubicación.

El municipio de Campeche, capital del Estado de Campeche, se encuentra ubicado entre los paralelos 90° 41' y 19° 51' y posee una extensión territorial de 3,410 Km, es el más densamente poblado de los 11 municipios que conforman el Estado, con 222 452 habitantes. Su clima es cálido subhúmedo, con temperaturas que oscilan entre 28°C y 34°C. En este municipio se localiza la capital del Estado que tiene un intenso

movimiento migratorio por sus atractivos turísticos. La ocupación que predomina es la pesca, la agricultura y el comercio.

III.4.2. Universo de estudio.

Diariamente, durante los años 1999 y 2000, se colectó el total de muestras de suero de individuos febriles de 5-10 días de evolución, que acudieron a consulta en los tres hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social, que es una institución del sector salud que proporciona atención médica a la mayoría de los habitantes del municipio.

III.4.3. Obtención de la muestra.

Previo llenado de la hoja de consentimiento informado (se anexa formato), se obtuvieron muestras de suero (del sexto al décimo día de haberse presentado la fiebre) mediante punción venosa, se separó el suero y las muestras correspondientes, fueron transportadas en frío (4°C) hasta el laboratorio del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (C.I.E.T.) para su procesamiento.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

No.

Fecha: _____

Enterado de la importancia y necesidad de que se me realice una toma de muestra para establecer el diagnóstico del cuadro clínico que actualmente presento y ante la aparición de la enfermedad viral denominada Dengue que actualmente está afectando a la comunidad, doy mi aceptación para que se me tome muestra sanguínea, así como responder un cuestionario indispensable para completar la información del estudio.

Nombre del paciente: _____

Firma:

Nombre del padre o tutor: _____

Firma: _____

III.4.4. Determinación de IgM- Dengue por MAC-ELISA

Para la detección de anticuerpos IgM se empleó el método propuesto en el acápite III.2.5.

III.4.5. Visitas Domiciliarias.

Todos aquellos pacientes que resultaron positivos a dengue por detección de anticuerpos IgM, fueron visitados en sus domicilios con el objeto de obtener información sobre viajes recientes, cuadro clínico, hábitos de higiene y saneamiento ambiental. Para ello se utilizó el modelo de encuesta presentado en el acápite III.2.3. En cada caso, se solicitó el consentimiento informado.

III.4.6. ELISA de Inhibición.

Todos los sueros obtenidos fueron procesados por la técnica de ELISA de Inhibición con la finalidad de medir los anticuerpos IgG antidengue. Esta técnica recientemente se había implementado en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Autónoma de Campeche, siguiendo todo el procedimiento recomendado por los autores (Vázquez y cols., 1997).

Procedimiento.

Fueron sensibilizadas placas de poliestireno (Nunc) con Igs humanas anti-dengue a una concentración de 10µg/mL en buffer carbonato/bicarbonato pH 9,5 se colocaron las placas en cámara húmeda y se dejaron en incubación a 4°C durante 18 horas. Se bloqueó con Albúmina sérica Bovina (Sigma) al 1% durante una hora a 37°C, se lavaron tres veces las placas en PBS-Tween 20 (PBS-T), y se agregó 100 µL por pozo del antígeno a una dilución 1/40 dejándose en incubación una hora a 37°C, nuevamente se lavaron las placas en PBS-T y se agregaron 100µL de los sueros diluidos 1/20 en PBS-T al igual que los sueros controles, se incubaron a 37°C durante una hora, se lavaron las placas tres veces y se añadió el conjugado anti-dengue-peroxidasa 100µL por pozo, se dejó en incubación a 37°C durante una hora, posteriormente se lavaron las placas y se les agregó el sustrato compuesto por Ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución fosfato-citrato con pH 5, 100µL por pozo durante 30 minutos; la reacción se detuvo con 100µL por pozo de ácido sulfúrico al 12.5%, las lecturas se realizaron en un lector de ELISA Titertek Multiskan a una densidad óptica de 492nm.

Se calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra por la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Inhibición de ELISA} = 1 - \left[\frac{\text{DO de la muestra}}{\text{DO de la media del control negativo}} \right] \times 100$$

Criterio de positividad:

Se consideraron positivos aquellos sueros que presentaron un % de inhibición mayor o igual al 50% con relación al control negativo (Vázquez y cols., 1997).

III.5. Conocer la seroprevalencia a los virus dengue en el Estado de Campeche.

III.5.1. Tipo de estudio.

Estudio retrospectivo, en el que se realizó una encuesta seroepidemiológica a la población del Estado de Campeche, en el año 2002.

III.5.2. Muestreo.

Se realizó un muestreo estratificado (Lohr, 2000), en el que se dividió a la población en subpoblaciones llamadas estratos (Municipios). Se obtuvo una muestra independiente de cada estrato y posteriormente se reunió la información para obtener las estimaciones globales de la población. El tamaño de la muestra se obtuvo por el método de estimación de proporciones:

El nivel de confianza Z se estableció en 99% (2.58) requerido para inferir resultados a la población, se eligió una precisión para el estudio (d^2) igual a 0.05, resultando el tamaño de la muestra (n) en 600 habitantes, los cuales se distribuyeron proporcionalmente en los municipios a encuestar. En los municipios se seleccionaron al azar las viviendas a encuestar y se le tomó muestra, a un individuo por vivienda, (cuando la persona seleccionada no aceptaba que se le tomara muestra, se determinó encuestar a otro individuo de la vivienda contigua) (Polit, 1997). Encuesta descrita en el acápite III.2.3.

III.5.3. Toma de muestra de sangre entera absorbida en papel filtro.

Se utilizó este método por las ventajas que ofrece para los estudios serológicos, por ser un método sencillo, económico y rápido para la toma de muestras de sangre entera. Entre las principales ventajas que ofrece se encuentra la facilidad para obtener la muestra de sangre, especialmente en niños y en personas que resulta difícil la extracción de sangre venosa, así como su fácil transporte y almacenamiento (Vázquez et al., 1998).

Aspectos éticos:

Para el presente estudio se siguieron los aspectos éticos establecidos en el estado de Campeche a cada paciente o padres en el caso de niños, se les solicitó llenar y firmar la hoja de consentimiento informado (se anexa).

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

No.

Fecha: _____

Enterado de la importancia del estudio denominado “Seroprevalencia de los virus del dengue en el Estado de Campeche”, doy mi consentimiento para que se me tome una muestra sanguínea, así como responder a un cuestionario necesario para completar la información del estudio

Nombre del paciente: _____

Firma: _____

Nombre del padre o tutor: _____

Firma: _____

Procedimiento.

Previa desinfección se puncionó el dedo índice con una lanceta y la sangre se dejó absorber sobre el papel filtro (Blood Sampling Paper, NOBUTO, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japón) hasta dejar ambos lados impregnados. Se dejó secar la sangre a temperatura ambiente y se colocó el papel filtro en posición vertical con la Zona B (figura 6) situada hacia abajo y evitando exponerlo a temperaturas elevadas.

Se eluyeron durante toda la noche a 4°C en 400 µL de solución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía albúmina bovina al 0.5%, lo que correspondía a una dilución del suero de 1/10 según las indicaciones del fabricante, posteriormente en cada muestra se aplicó la técnica de ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos IgG contra el virus del dengue (Vázquez et al., 1997).

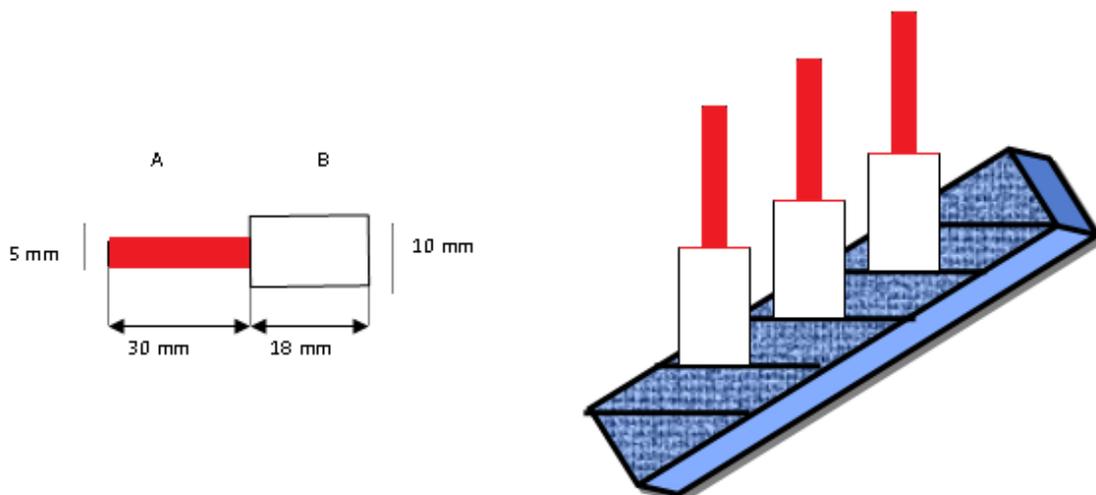


Figura 6. Papel de filtro empleado en el estudio. Zona A = absorción de sangre y zona B = identificación de las muestras.

III.5.4. ELISA de Inhibición.

Se realizó el procedimiento descrito en el acápite III.3.6.

III.5.5. Neutralización.

Se realizó el procedimiento descrito en el acápite III.4.5.

III.5.6. Métodos estadísticos empleados para el análisis de los resultados.

Se aplicó el método de estadística descriptiva.

Capítulo IV. Resultados y Discusión.

IV.1. Incidencia de casos de dengue en el estado de Campeche, México, de 1990-2005.

Hasta el momento de nuestro estudio, en Campeche no existían estudios seroepidemiológicos de dengue y dada la no existencia de datos actuales sobre la circulación y diseminación de los serotipos, este trabajo describe la circulación del virus dengue en el estado de Campeche en un período de dieciséis años, que se puede apreciar en la tabla 4, donde se presenta el número de casos confirmados de dengue por año y los virus circulantes.

En el estado de Campeche, los primeros casos de dengue registrados (1980) fueron ocasionados por el serotipo 1, haciéndose endémico en toda la región, en los años siguientes hubo un incremento de casos: 175 casos en el año de 1984 y 645 casos en 1988. Esta información fue recopilada en los archivos de la secretaria de salud del estado de Campeche.

La FHD hace su presencia en el estado en el año de 1995. En el año de 1997 se presentó la epidemia mas importante que se ha tenido en el estado de Campeche.

En los últimos años se ha incrementado el número de casos de FD y FHD (Boletín de Epidemiología 2005), por lo que es importante conocer los factores de riesgo que se están presentando y que podrían ser los detonantes para que se presenten brotes de las formas graves del dengue.

Se observó que cada dos años se produjo un descenso en la incidencia seguido de dos o tres años de incremento en el número de pacientes. En la década de los noventa los casos de dengue fueron frecuentes, con una elevación a partir del año 1994 con un pico máximo de incidencia en el año 1997, con 4927 casos.

En 1997 se presentó la epidemia más importante que ha tenido el estado de Campeche, en la que se dio la introducción de un nuevo serotipo (serotipo 3) y la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus dengue, por lo que era de esperarse un mayor número de casos de FD y de casos hemorrágicos por los susceptibles a un nuevo serotipo y por los que tuvieron una infección de tipo secundaria que como han referido otros autores (Halstead, 1993; Gubler y Clark, 1995). La secuencia de infecciones

secundarias, aumentan el riesgo de desarrollo de casos de FHD, como ocurrió en Cuba en 1981, con solamente la circulación de dos serotipos (Guzmán y Kourí, 2003a).

Tabla 4. Número de casos y serotipos circulantes en el período de 1990-2005 en el estado de Campeche.

| Años | No. de Casos | Serotipos |
|------|--------------|----------------------------|
| 1990 | 33 | DEN-1 |
| 1991 | 37 | DEN-1 |
| 1992 | 18 | DEN-1 |
| 1993 | 19 | DEN-1 |
| 1994 | 92 | DEN-1, DEN-2, DEN-4 |
| 1995 | 58 | DEN-1, DEN-2, DEN-4 |
| 1996 | 177 | DEN-1, DEN-2, DEN-4 |
| 1997 | 4927 | DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 |
| 1998 | 292 | DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 |
| 1999 | 79 | DEN-2, DEN-3, DEN-4 |
| 2000 | 155 | DEN-2, DEN-3 |
| 2001 | 53 | DEN-2 |
| 2002 | 372 | DEN-2 |
| 2003 | 7 | DEN-2 |
| 2004 | 27 | DEN-2, DEN-4 |
| 2005 | 93 | DEN-1, DEN-2 |

Casos confirmados (6439) de dengue por detección de Acs IgM y/o aislamiento viral. Fuente: Secretaria de Salud del Edo de Campeche.

El dato de la edad en todos los casos confirmados no estaba disponible en los archivos de la Secretaria de Salud del Estado de Campeche.

Dada la importancia de la epidemia de 1997, merece ser comentada más ampliamente. La misma se inició en todo el municipio de Campeche en el mes de enero con un caso de FHD. En el mes de julio, se detectó un número importante de casos en el municipio del Carmen (120 casos), el mayor número de casos fue notificado en los meses de agosto, septiembre y octubre, coincidiendo con el período de lluvias; los municipios más afectados resultaron los más densamente poblados como Campeche, Champotón, Carmen, Calkiní y Hecelchakán. Los casos de dengue hemorrágico fueron más frecuentes durante los meses de enero y octubre, o sea, al principio y al final de esta epidemia, estos datos se obtuvieron de un reporte de la secretaria de salud del estado de

Campeche (SSA, 1198). Se observó un incremento de los casos, a medida que la epidemia avanzaba (Figura 7). El número de casos se incrementó a partir de la semana 28 y hasta la 44, cuando inicia el descenso en el reporte de casos.

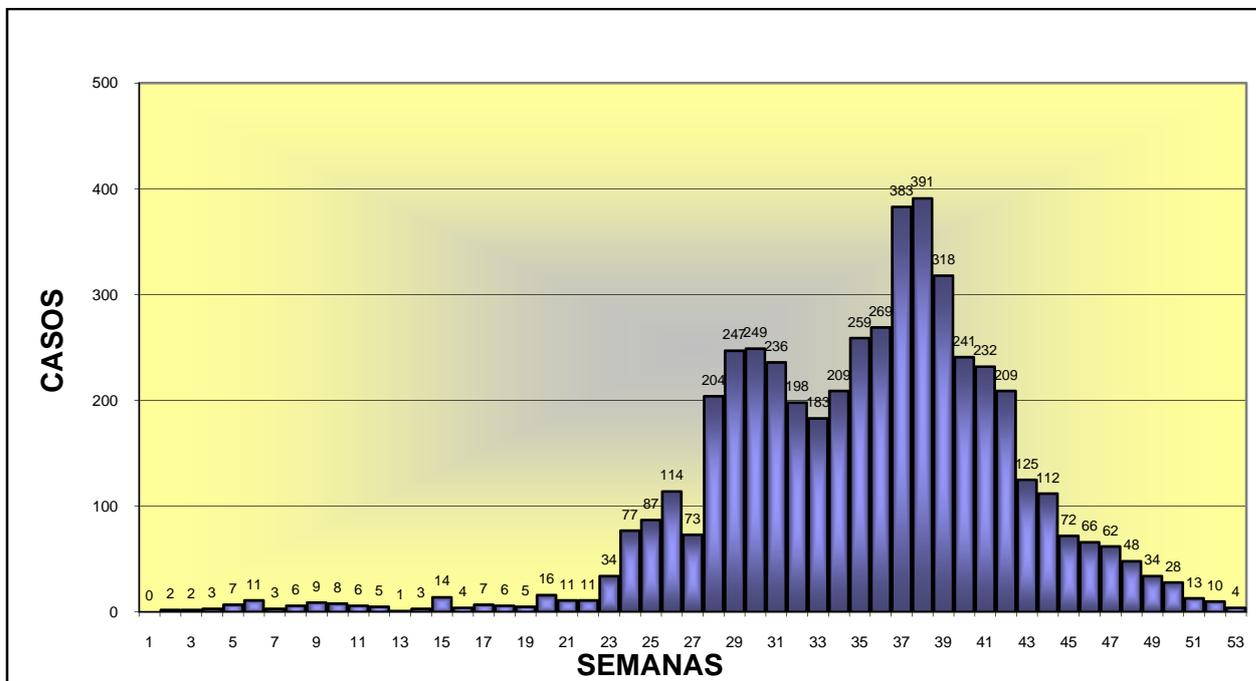


Figura 7. Casos confirmados de dengue por semana durante la epidemia de 1997 en el Estado de Campeche.

En esta epidemia hubo un total de 4 927 casos, de ellos 4 745 (96.3%) casos de FD, 62 (1.3%) casos de FD con manifestaciones hemorrágicas, y 120 (2.4%) casos de FHD; fallecieron cuatro personas (3.3% letalidad) por FHD, todos ellos adultos. Los casos de FD con manifestaciones hemorrágicas presentaron signos de alerta como sudoración profusa, hipotensión arterial, gingivorragia y vómitos frecuentes; todos estos pacientes fueron hospitalizados y se confirmó el diagnóstico por serología.

Los municipios afectados por FHD fueron: Campeche, Carmen, Escárcega, Champotón, Calakmul, Hopolchén, Calkiní y Tenabo. Fallecieron dos pacientes en el municipio de Campeche, uno del sexo femenino de 25 años de edad y el otro del sexo masculino de 17 años; y dos fallecieron en el municipio de Calakmul, del sexo femenino de 23 y 17 años de edad. El último caso de esta epidemia, fue reportado en diciembre del mismo año. Es de señalar que 27 países de Centro, Sudamérica y del Caribe reportaron casos de dengue en el año de 1997, de estos, 14 reportaron casos de FHD y 8 países reportaron decesos por FHD (Guzmán, Kourí, Bravo, 1999b; Isturiz y Gubler, 2000).

Entre los factores que pudieron ser determinantes para la presencia de esta epidemia, se consideraron la migración, la urbanización no planificada, el abastecimiento irregular de agua potable, la falta de drenaje y los insuficientes servicios de recolección de basura en las áreas suburbanas, incrementando la presencia y diseminación del mosquito en el Estado, así como condiciones climatológicas adversas, como la presencia del Huracán Paulina en octubre de ese mismo año, que causó serias inundaciones que pueden haber favorecido el incremento de la densidad del vector. Con frecuencia, los campesinos de Guatemala buscan refugio en el estado de Campeche, debido a la pobreza extrema existente en su país, que vienen en busca de mejores condiciones de vida, muchos de los cuales llegan enfermos, con una desnutrición crónica importante, exacerbándose su estado de salud al tener que vivir en casas improvisadas, carentes de servicios básicos, que favorecen la presencia de vectores como *Aedes aegypti*.

Se observó que en la epidemia de 1997, la transmisión tardó más en llegar a la zona rural, y fue de duración más breve, porque pronto se acabaron los susceptibles (observación personal de la autora durante el desarrollo de este trabajo); en las ciudades grandes la introducción de la infección fue mayor por los canales de comunicación y migración, la transmisión persistió más tiempo porque el número de susceptibles era mayor. En esta epidemia se confirmaron 1285 (26%) niños con dengue, de los cuales 26 presentaron FHD; siendo más frecuente en el rango de edad de 5-14 años.

En los últimos cinco años del estudio, se ha mantenido la circulación de dengue con el reporte de 155 casos en el 2000, 372 casos en el 2002 con 8 casos de FHD, y 93 casos en el 2005 con 18 casos de FHD.

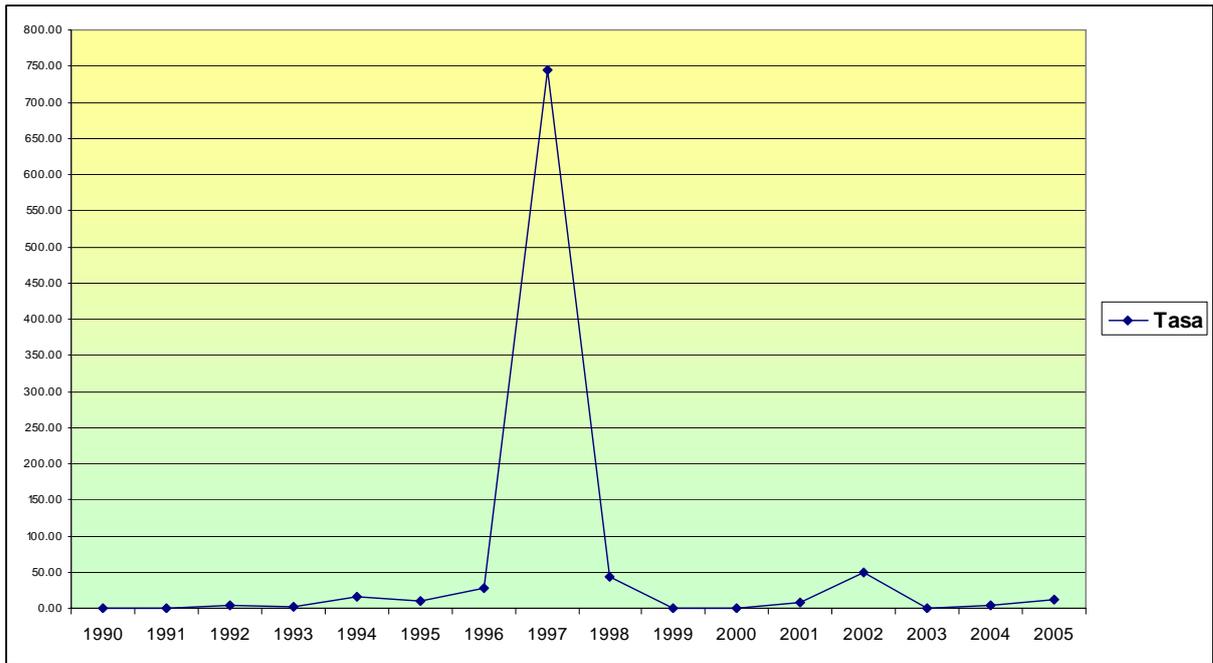


Figura 8. Tasa de dengue x 100 000 habitantes de 1990-2005 en el Estado de Campeche

La diseminación del dengue en el Estado de Campeche ha sido paulatina, inicialmente afectó a los municipios del Centro y Sur del Estado y posteriormente a los del Norte. Los datos observados en las tasas de dengue por 100 000 habitantes en el estado de Campeche (figura 8) y el total de casos por municipios en el período estudiado (Figura 9) nos indican que si bien el dengue está distribuido en todo el estado, la dinámica de transmisión ha sido variable de una localidad a otra, dependiendo de las condiciones ecológicas y geográficas. Las condiciones ecológicas de cada región se reflejan en el clima, el patrón pluvial, el tipo de vegetación y las formas en que se organiza el hombre para adaptarse a ellas. Los municipios que resultaron con una mayor incidencia fueron Campeche, Carmen, Champotón y Calkiní, los más densamente poblados.

Entre las características ecológicas que puede favorecer la presencia el vector y la transmisión viral con los municipios que presentaron los porcentajes más elevados de positividad, cabe mencionar que el de Campeche tiene una extensión territorial de 3,410 Km², con clima cálido subhúmedo, una temperatura media anual de 28°C, con un intenso movimiento migratorio, por el turismo y el comercio, además de que en este municipio se localiza la capital del Estado. El municipio de Carmen tiene una extensión territorial de 13,134 Km², su temperatura más calurosa es de 45.4°C, y tiene un elevado

número de población flotante, que permanece de dos a seis meses al año, que posteriormente regresan a su lugar de origen. El municipio de Champotón es el más extenso del Estado, ya que ocupa 19,439 Km², con un clima cálido subhúmedo, su temperatura media anual es de 26°C, la mayoría de sus pobladores se dedica a la pesca y la agricultura, actividades que llevan a cabo por la noche y algunas horas de la mañana, a partir del mediodía permanecen en sus casas. El municipio de Escárcega cuenta con una extensión territorial de 3706 Km², su clima es cálido húmedo, presenta una proporción importante de población inmigrante y tiene una precipitación pluvial de 1549.9 mm. El período de lluvias es más intenso de Junio a Octubre. Todos estos municipios tienen una alta densidad poblacional, por los nuevos asentamientos humanos que de manera desordenada se ubican en la periferia de las cabeceras municipales en viviendas improvisadas y carentes de servicios adecuados como el agua potable, por lo que tienen que almacenarla en recipientes que sirven como criaderos al vector, favoreciendo la amplia circulación de los virus del dengue.

En el estado de Campeche existen localidades que han sufrido dengue en forma repetida, mientras que existen otras donde aun no se ha presentado. La temperatura, el clima y la altitud son los factores predictivos más importantes de las tasas de infección en diferentes comunidades; por lo tanto, el patrón de transmisión es preferentemente endémico en las áreas tropicales, mientras que en las regiones con mayor altitud y climas mas templados el patrón tiende a ser de tipo epidémico. La densidad de población resultó un factor fundamental en el patrón de transmisión, ya que la posibilidad de que se transmita el virus es mayor y con tasas de ataque más altas que en una situación donde son pocos los individuos disponibles, como en las áreas rurales, donde la población se encuentra más dispersa.

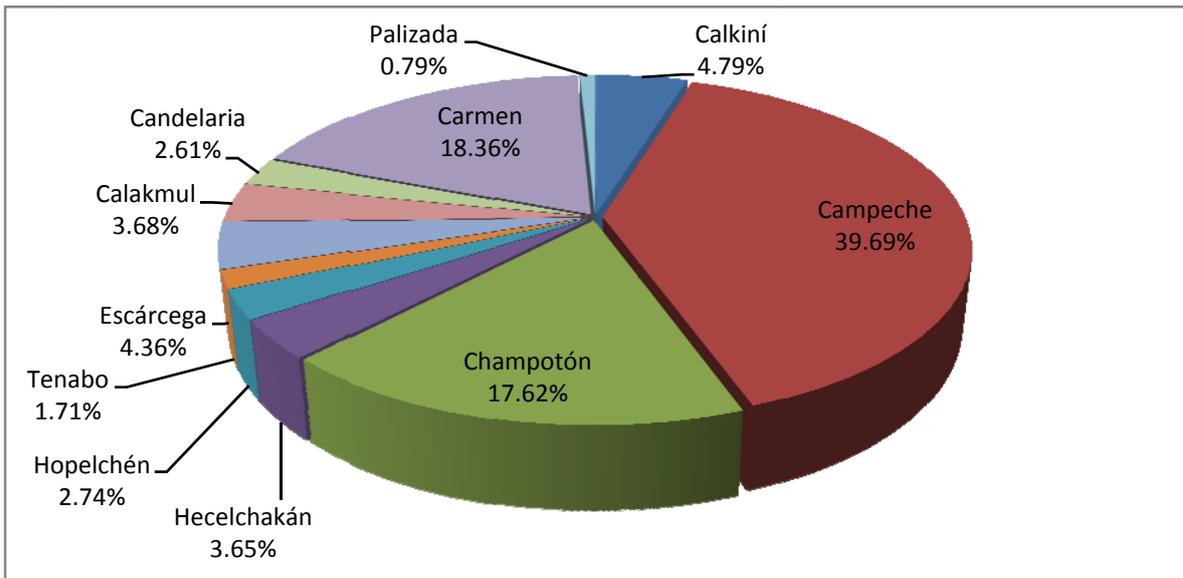


Figura 9. Porcentaje del total de casos por municipio en el estado de Campeche.

Las localidades donde el dengue se ha presentado en forma endémica resultaron ser grandes centros urbanos, con baja marginación y extensa dotación de servicios públicos. La incidencia de casos de FHD/SCD se ha incrementado en los últimos años en el estado, resultando más alta en los grupos de 15 a 44 años. (Figura 10) similar a lo reportado en Singapur (Wilder et al., 2004).

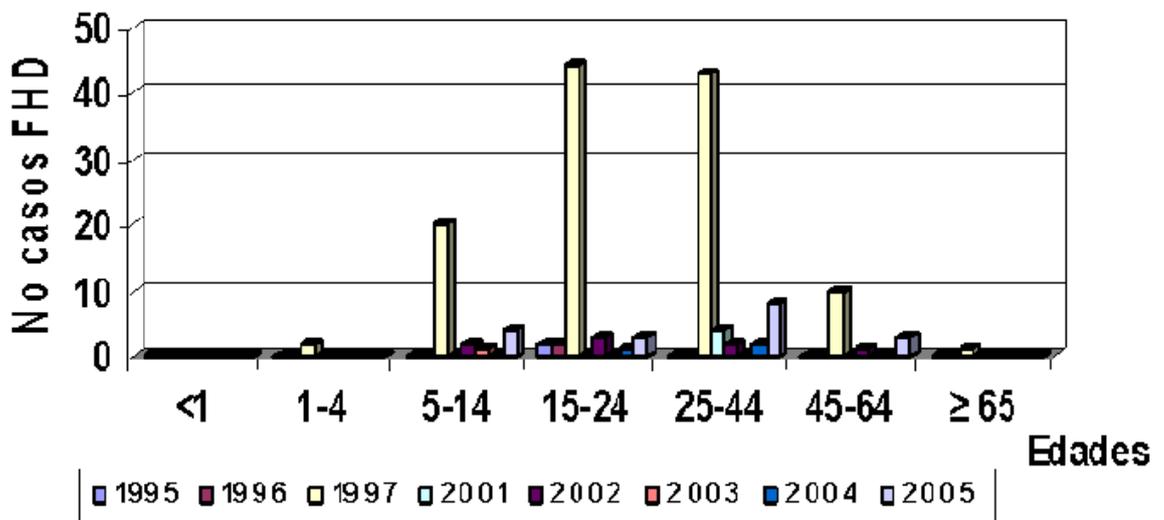


Figura 10. Número de casos de dengue hemorrágico por grupos de edad en el estado de Campeche en el periodo 1996-2005

En total fueron 158 los casos de FHD detectados en el estado en los 16 años de este estudio (tabla 4). En el Estado de Campeche el comportamiento del dengue ha sido diferente con respecto al de otros países, pues a pesar de haber permanecido constante desde la aparición del serotipo 1, seguida del dengue 2 con ligeras disminuciones e incrementos de casos, fue hasta después de 15 años de la entrada del dengue 1, que se presentaron las formas severas de la enfermedad, contrario a lo sucedido en otros países como Cuba, Colombia, Puerto Rico y Brasil, que con la secuencia de infecciones a estos dos serotipos tuvieron epidemias de FHD (Guzmán, Kourí, Bravo, 1999b).

El dengue 1 hace su aparición en el estado de Campeche a partir del año 1980, permaneciendo a lo largo de más de dos décadas (Tabla 3), en 1999 desaparece y es hasta el año 2005 que reaparece nuevamente. Sin embargo no ha sido causa de las formas graves de la enfermedad en los años que se ha detectado la circulación de este serotipo, la mayoría de los casos han resultado ser de FD.

Sin embargo, en el año de 1997 solamente en México, Costa Rica, Guatemala, Belice y Honduras se reportó la presencia del dengue 3 (SSA, 1998; Figueroa y Ramos, 2000), situación que pudo incrementar la circulación de un nuevo serotipo en otros países, aumentando la frecuencia de infecciones secundarias y, consecuentemente, el riesgo de presentarse casos de FHD. También en 1997, México y Guatemala fueron los únicos países que reportaron la circulación simultánea de los cuatro serotipos (SSA, 1998) incrementándose el número de casos de FD y de casos de FHD/SCD. En Campeche han sido pocos los casos de FHD en niños, la mayoría ha resultado en adultos (Tabla 5), contrario a lo descrito por Gubler et al., (1979) y Sukri (2003) que observaron un elevado número de casos de FHD/SCD en niños en el Sudeste Asiático. Fue a partir de 1981, que se empezaron a notificar con mayor frecuencia los casos graves en adultos, tanto en América como en el Sudeste asiático (Gubler y Clark, 1995; Valdés et al., 1999). En América todos los grupos de edad se han visto afectados (Isturiz y Gubler, 2000; Torres J, Torres Jr, Torres CG, 2002).

Tabla 5. Dengue hemorrágico en la población del estado de Campeche

| Año | Adultos | Niños | Tasa |
|--------------|----------------|--------------|-------------|
| 1995 | 2 | - | 0.33 |
| 1996 | 2 | - | 0.31 |
| 1997 | 98 | 22 | 18.29 |
| 1998 | - | - | 0.00 |
| 1999 | - | - | 0.00 |
| 2000 | - | - | 0.00 |
| 2001 | 4 | - | 0.57 |
| 2002 | 6 | 2 | 1.09 |
| 2003 | - | 1 | 0.13 |
| 2004 | 2 | 4 | 0.39 |
| 2005 | 14 | - | 2.32 |
| Total | 129 | 29 | |

La presencia de una elevada población susceptible de sufrir una infección primaria como secundaria, el intercambio turístico y comercial con áreas endémicas, la sobrepoblación en las áreas urbanas, la circulación simultánea de los cuatro serotipos, así como los elevados índices de *Aedes aegypti*, crearon las condiciones necesarias para la aparición de un elevado número de casos de FD/FHD en el estado de Campeche en los últimos diez años (Figura 11). Los municipios que tuvieron mas casos de dengue hemorrágico (Campeche, Carmen, Escárcega, Champotón, Calakmul) fueron aquellos con un mayor reporte de casos de dengue y densidad poblacional.

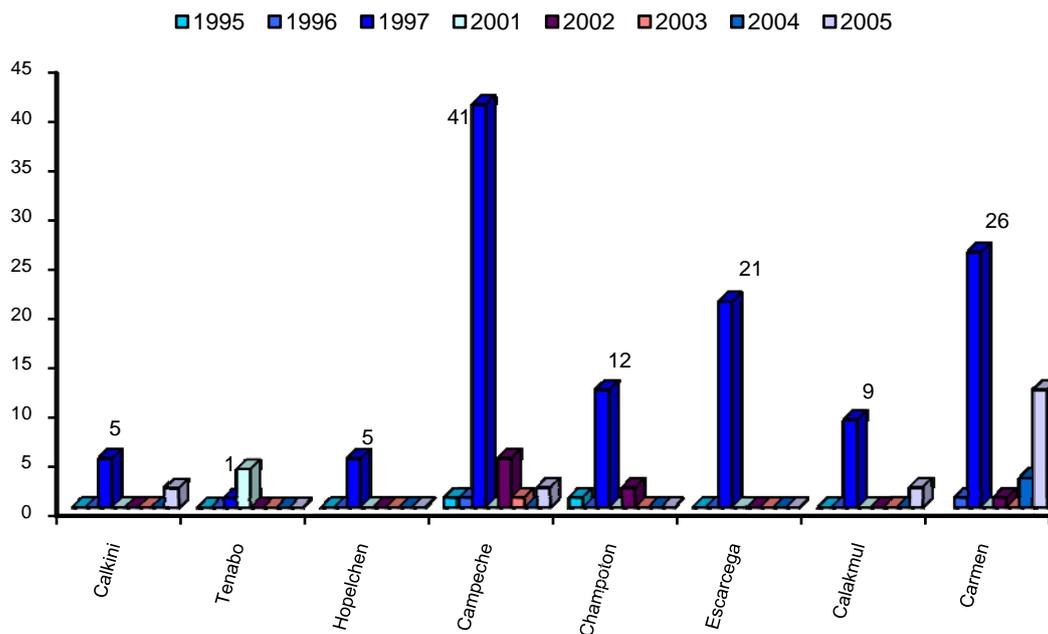


Figura 11. Municipios afectados por dengue hemorrágico en el Estado de Campeche en el periodo 1995-2005.

Por lo que podemos considerar que Campeche es un estado donde el dengue es endémico, en el que se han presentado períodos de baja endemia, seguido de otros hiperendémicos (cocirculación de los serotipos) como en los años 1997, 2000 y 2004. Actualmente el serotipo que está circulando es el DEN-2, con un incremento en el número de casos de FHD.

El factor agua fue determinante en los brotes epidémicos que se han presentado en el estado, el número de casos se incrementó en el período de lluvias y se tuvieron dos epidemias asociadas a fenómenos meteorológicos, que favorecieron la elevación de la densidad del vector.

En zonas tropicales persistentemente infectadas por mosquitos vectores del dengue en particular por *Aedes aegypti* es fácil suponer que las epidemias aparezcan como consecuencia de cambios bruscos en la dinámica de la población humana, de vectores, o de virus (Woodring, Higgs, Beaty, 1996; Wittke et al., 2002); independientemente de la importación de nuevas infecciones desde otra localidad. En Campeche el dengue ha tenido un comportamiento similar, en este trabajo se observó que ha habido una amplia circulación y cocirculación de los virus del dengue, hallazgos que señalan la importancia que cobra la transmisión de estos virus en el estado y resaltan el panorama de riesgo de aparición de un mayor número de casos de las formas severas FHD/SCD.

IV.2. Estudio seroepidemiológico a virus dengue en escolares de la Ciudad de Campeche en el año 1994.

Es importante aclarar que no fue posible obtener las 353 muestras establecidas en el cálculo estadístico, porque algunos niños no accedieron se les tomara muestra en el segundo periodo del estudio.

Se estudió una población de 327 escolares, de los cuales 152 (46.48%) correspondieron al sexo masculino y 175 (53.52%) al sexo femenino, con un rango de edad de 7 a 14 años y pertenecientes a 5 colonias como se observa en la figura 12. Se consideraron casos de infección reciente aquellos escolares cuyos sueros fueron positivos a IgM en cualquiera de los dos muestreos, considerando que los anticuerpos IgM pueden permanecer entre 7 y 90 días después de la infección (Lam et al. 1998); así como aquellos cuyos sueros que presentaron títulos de anticuerpos IH \geq 1:1280 (OPS, 1995).

Se encontró que el 17.4% (57/327) de estos escolares presentaron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el virus del dengue; los títulos de anticuerpos por IH encontrados en estos niños, fluctuaron desde 1:20 hasta 1:2560. De estos 57 niños que resultaron positivos por IH, dos (0.61%) presentaron anticuerpos IgM al virus dengue durante el primer muestreo; estos mismos niños al ser encuestados no presentaron signos o síntomas sugestivos de la enfermedad. Estos fueron los únicos dos casos con anticuerpos IgM a dengue durante el primer muestreo.

Durante los meses de octubre y noviembre (período de lluvias) se realizó el segundo muestreo a estos escolares, se obtuvieron nuevamente 327 muestras, de las cuales 31 (9.5%) presentaron anticuerpos IgM a virus dengue (tabla 6), siendo importante aclarar que en el momento del estudio estos niños se encontraban clínicamente sanos y refirieron no haber presentado manifestaciones clínicas de la enfermedad con anterioridad, ni recientemente; aparentemente estos niños cursaron asintomáticos cuando tuvieron su primera infección. Al analizar los resultados de estudio de IgM y anticuerpos IH tanto en el primero como en el segundo muestreo se observó que 10 casos desarrollaron una infección primaria en el periodo de estudio y 21 una infección secundaria (títulos de anticuerpos IH \geq 2560). Dos casos presentaron infección reciente durante el primer muestreo (tabla 6).

Tabla 6. Resultados serológicos por MAC-ELISA e IH y tipo de infección en los escolares de la Ciudad de Campeche, en el año 1994.

| No DE CASOS | Primer muestreo (marzo-abril) | | | Segundo muestreo (octubre-noviembre) | | |
|-------------|----------------------------------|----------|-------------------|---|----------|-------------------|
| | IH Título | IgM | TIPO DE INFECCIÓN | IH Título | IgM | TIPO DE INFECCIÓN |
| 6 | <20 | Negativo | ----- | 640 | Positivo | Primaria |
| 1 | 320 | Positivo | Reciente | 160 | Negativo | Pasada |
| 1 | 640 | Positivo | Reciente | 640 | Negativo | Pasada |
| 3 | 20 | Negativo | Pasada | 2560 | Positivo | Secundaria |
| 22 | 40 | Negativo | Pasada | 40 | Negativo | Pasada |
| 3 | <20 | Negativo | ----- | 2560 | Positivo | Secundaria |
| 1 | <20 | Negativo | ----- | 40 | Positivo | Primaria |
| 7 | 40 | Negativo | Pasada | 2560 | Positivo | Secundaria |
| 4 | 20 | Negativo | Pasada | 2560 | Positivo | Secundaria |
| 3 | <20 | Negativo | ----- | 320 | Positivo | Primaria |
| 4 | 40 | Negativo | Pasada | 2560 | Positivo | Secundaria |
| 2 | 20 | Negativo | Pasada | 20 | Negativo | Pasada |

Se acudió a los domicilios de los escolares que resultaron positivos de anticuerpos y se estableció que el 70% de las viviendas visitadas, presentaban condiciones favorables para la proliferación de *Aedes aegypti*; como acúmulos de basura, almacenamiento de agua por largo tiempo, almacenamiento de neumáticos, latas y botellas de plástico. También se detectó en las colonias Huanal y Santa Lucía, un canal de desagüe pluvial y un cementerio en donde abundan jarrones con flores naturales donde el agua queda almacenada por largo tiempo. En la colonia Samulá se localizó un deshuesadero

(cementerio de carros), constituyendo todos éstos criaderos potenciales de *Aedes aegypti*.

Las colonias donde se detectó el mayor número de casos recientes fueron Samulá, Huanal, San José y Santa Lucía (Figura 12), estos niños procedían de familias con un bajo nivel socioeconómico.

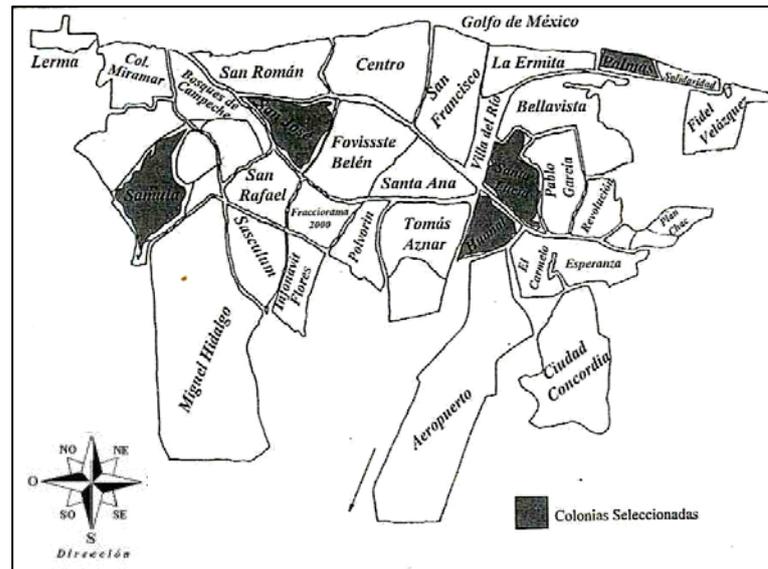


Figura 12. Colonias seleccionadas para el estudio Seroepidemiológico a dengue en escolares de la ciudad de Campeche.

Es de señalar que en el mes de septiembre de 1994 se reportó por primera vez, la presencia del serotipo 4 (Secretaría de Salud 1996) por lo que toda la población era susceptible a este virus. Este evento coincidió, con el período en el que se inició el segundo muestreo y en el que se obtuvo un número importante de casos recientes.

Con respecto al sexo, fue más frecuente en el femenino con 31 positivos (54.38%), y 26 (45.61%) correspondieron al sexo masculino, resultado similar al obtenido por Halstead 1980, por Moraes, Baeta, Costa, 1991 en Río de Janeiro, y Kourí et al. 1991 en Nicaragua; con una $P > 0.05$. Al analizar los grupos etáreos, se observó que el porcentaje de escolares que presentó anticuerpos IH contra el virus del dengue, se incrementó en relación directa con la edad (Tabla 7), esto indica que el porcentaje de niños infectados se incrementó a mayor edad, debido a que han tenido más oportunidad de estar en contacto con el virus.

Tabla 7. Distribución por edad de los escolares de la ciudad de Campeche con presencia de anticuerpos totales a dengue en 1984.

| EDAD | POSITIVOS | % |
|-------------|------------------|----------|
| 7 | 3 | 5.26 |
| 8 | - | - |
| 9 | 2 | 3.50 |
| 10 | 5 | 8.77 |
| 11 | 6 | 10.52 |
| 12 | 9 | 15.78 |
| 13 | 15 | 26.31 |
| 14 | 17 | 29.82 |
| Total | 57 | 99.96% |

El 10.1% del total de los escolares estudiados se infectó en el periodo de estudio, todos con una infección asintomática.

Estos resultados unidos a reportes previos por Burke et al., 1988; Guzman y Kourí, 2002; Chen et al., 1996. Apoyan la transmisión viral en ausencia de enfermedad. Podríamos señalar que existen lugares donde el dengue ha adquirido un equilibrio endémico, con una constante transmisión de baja intensidad, que puede pasar inadvertido para los sistemas de vigilancia epidemiológica tradicionales, debido a que un alto porcentaje de individuos infectados cursan asintomáticos, o bien, porque su sintomatología es tan leve que no amerita la búsqueda de consulta médica, aunque estén participando de forma activa en la cadena de transmisión.

Se observó una diferencia altamente significativa ($P < 0.0000006$), entre la presencia de casos durante el período de lluvias y el período de no lluvias, por lo que aparentemente

el factor lluvia fue de importancia en la transmisión, posiblemente debido a un incremento en los niveles de infestación del mosquito.

IV.3. Estudio de un brote de dengue en un área rural del Estado de Campeche.

En las áreas rurales en México la vivienda tradicional es de forma circular con muros de barro, techo de palma y piso de tierra, carecen de servicios adecuados y es común observar hacinamiento. El saneamiento ambiental es nulo por lo que se forman grandes acúmulos de basura y recipientes donde se crían los mosquitos. Al carecer de agua entubada los pobladores tienen que almacenar la misma en tanques y piletas en sus viviendas. La población de este ejido (pequeña comunidad) es de origen maya, con un nivel socioeconómico bajo.

Hasta el año 1997 no se habían detectado casos de dengue en las áreas rurales del Estado, siendo en el mes de octubre que una comunidad rural del municipio de Calakmul solicitó apoyo a la universidad por estar presentando sus habitantes un cuadro febril agudo y otras manifestaciones sugestivas de FD. Debe destacarse que durante el mes de octubre ocurrió un fenómeno meteorológico (Huracán Paulina) que pudo haber favorecido el incremento de la densidad del mosquito *Aedes aegypti*, ya que se crearon grandes acúmulos de agua. Durante los meses de octubre y noviembre fueron constantes los casos de FD detectados y confirmados por serología, presentándose el mayor número durante la segunda semana de noviembre. Esta población estaba conformada por 214 habitantes, de los cuales 61 enfermaron, resultando positivos por IgM un total de 53 individuos. De ellos 50 (94.3%) con FD y 3 (5.7%) con FHD. Los 8 individuos restantes aunque tenían un cuadro clínico sugestivo no se consideraron como caso confirmados por no tener la IgM positiva. Los casos confirmados predominaron en el sexo femenino con 31 (58.49%) casos y en el sexo masculino resultaron infectados 22 (41.51%), con una $P=0.89$ por lo que no fue significativo.

El rango de edad que predominó fue el de 21 a 40 años, sin embargo un número importante de niños resultó positivo (Tabla 8). En la tabla 9 se presentan las principales manifestaciones clínicas de los pacientes.

Tabla 8. Distribución por edad de los casos positivos a Dengue

| Grupo de Edades | Total de Muestras % | Muestras Positivas % | Índice |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1 – 10 | 16/61 (26.22%) | 14/53(26.41%) | 1.00 |
| 11 – 20 | 15/61 (24.59%) | 13/53 (24.52%) | 0.99 |
| 21 – 40 | 20/61 (32.78%) | 18/53 (33.96%) | 1.03 |
| 41 – 70 | 10/61 (16.39%) | 8/53 (15.09%) | 0.92 |
| Total | 61/61 (100%) | 53/53 (100%) | |

Índice: % de casos positivos por grupo etáreo entre % de personas estudiadas por grupo etáreo.

Tabla 9. Manifestaciones clínicas en pacientes confirmados de dengue, en el brote de área rural, Campeche 1997

| Manifestaciones clínicas | No. de casos | % |
|---------------------------------|---------------------|----------|
| Fiebre | 53 | 100 |
| Mialgias | 53 | 100 |
| Dolores óseos | 51 | 96 |
| Cefalea | 50 | 94 |
| Dolor retroocular | 46 | 87 |
| Epistaxis | 33 | 62 |
| Petequias | 33 | 62 |
| Gingivorragia | 33 | 62 |
| Vómitos | 8 | 15 |
| Dolor abdominal | 3 | 6 |
| Hipotensión arterial | 3 | 6 |
| Sudoración profusa | 3 | 6 |

Tres de los pacientes presentaron, además de la sintomatología antes mencionada, signos de alerta como vómitos, dolor abdominal, hipotensión arterial y sudoración profusa, por lo que fueron canalizados al Hospital Regional más cercano en el estado de Quintana Roo, en donde se confirmó el diagnóstico de FHD/SCD falleciendo dos de los mismos, los cuales fueron del sexo femenino, de 23 y 17 años de edad. En los dos pacientes que fallecieron, se confirmó por aislamiento viral que el agente etiológico fue DEN-3 (SSA, 1998) el paciente que sobrevivió tenía 33 años de edad.

La enfermedad se expresa en forma variable de acuerdo con los factores de susceptibilidad del huésped, las características de la cepa viral y/o la secuencia de las infecciones por los diferentes serotipos. En los niños menores de cinco años, el dengue puede confundirse con una enfermedad exantemática típica de este grupo de edad, por lo que el antecedente de estancia o residencia en áreas endémicas es muy importante (Monath, 1997; Kalayanarooj et al., 1997). En jóvenes y adultos el dengue se manifiesta con un cuadro más típico, caracterizado por un cuadro febril de más de dos días de duración, acompañado por dolor retroocular, dolor en músculos y articulaciones. Es común que aparezca un exantema morbiliforme que dura de uno a cinco días. La aparición de epistaxis o petequias es poco frecuente y varía con la edad, el sexo y las cepas del serotipo responsable, no obstante, en este brote un número importante de individuos presentó epistaxis. En las Bahamas, las manifestaciones hemorrágicas se informaron en 5% de los casos, en 24 a 38% en Puerto Rico, 11.4% en el sur de China, 2 a 9% en México, 16% en Brasil y tan elevado como 90% en las islas Niue (Zagne, Alvez, Nogueira, 1994; Ibraim y Cheong, 1995; Dietz et al., 1996; Rigau, 1997).

Sólo en 10 de las 53 muestras de suero colectadas de los enfermos, presentaron volumen suficiente para la prueba de neutralización; y se encontró que solamente un paciente (número 7) del sexo femenino y de 11 años de edad presentó una infección primaria por el serotipo 3, esta paciente presentó un cuadro de FD con manifestaciones hemorrágicas (epistaxis, petequias y prueba del torniquete positiva). En seis pacientes se observó infección secundaria. Los pacientes 5, 9 y 32 cursaron con manifestaciones hemorrágicas, dos de los cuales requirieron hospitalización (Tabla 10).

Los niños negativos de anticuerpos neutralizantes pero positivos por IgM podrían estar cursando una infección primaria donde los anticuerpos IgG no estaban lo suficientemente elevados como para producir neutralización. En un estudio cinético de anticuerpos IgM e IgG realizados por Vázquez et al. (2007), en muestras de sueros procedentes de pacientes con infección primaria y secundaria, encontraron que los cuatro casos que presentaron infección primaria con IgM positiva, no mostraron presencia de anticuerpos neutralizantes, entre los 5 y 7 días.

**Tabla 10. Resultados del estudio de neutralización en 10 sueros
de pacientes confirmados de dengue**

| PACIENTE | EDAD | D1 | D2 | D3 | D4 | |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1 | 6 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 5 | 15 | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo | Secundario |
| 7 | 11 | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Primario |
| 8 | 9 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 9 | 7 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Secundario |
| 28 | 8 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 32 | 27 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Secundario |
| 35 | 18 | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Secundario |
| 37 | 21 | Positivo | Positivo | Negativo | Negativo | Secundario |
| 40 | 9 | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | Secundario |

La presencia de anticuerpos neutralizantes a 3 o 4 serotipos del virus dengue observada en 6 de los sueros sugiere, que los pacientes de FD han sido infectados por mas de un serotipo de dengue. No obstante para poder garantizar con certeza los serotipos infectantes se necesita estudiar muestras de suero colectadas en la etapa convaleciente tardía no disponibles en este estudio. Se realizó un interrogatorio exhaustivo a los pacientes, estos refirieron haber realizado viajes periódicos al estado vecino de Quintana Roo, pero no realizaron viajes a países vecinos (Belice y Guatemala), únicamente una familia refirió haber hospedado en su domicilio a un familiar procedente de Guatemala un mes antes de haberse iniciado este brote; existe una constante migración del país antes mencionado hacia México a través de esta región, debido a la pobreza extrema en que viven. Con los antecedentes de la introducción de un nuevo serotipo (DEN-3) al estado de Campeche en el transcurso de ese mismo año y la muerte de dos de los pacientes debida al serotipo 3, así como la circulación simultánea de los cuatro serotipos en el estado de Campeche (Figura 13) ese mismo año (SINAVE, 1998), es probable que este serotipo haya sido el predominante en este brote. Sólo México, Guatemala, Costa Rica, Belice y Honduras reportaron en 1997 la circulación del DEN-3 (Guzmán, 1999b), serotipo que ha sido responsable de epidemias y de casos de FHD en

otros países. El virus DEN-3 se aisló por primera vez en las Américas en los años 1963-1964, ocasionando en Puerto Rico y Colombia importantes epidemias de FD (Pinheiro y Corber, 1997; Wilson y Chen, 2002). Algunas epidemias han sido causadas por este virus, pero también han existido epidemias con un elevado número de casos de FHD/SCD (Gubler y Clark, 1995; Guzmán y Kourí, 1996). El virus DEN-3 desapareció a partir del año 1977 y en 1994 reapareció en Nicaragua, Panamá y Costa Rica, extendiéndose posteriormente a otros países de la región, ocasionando grandes epidemias de FHD en Brasil y Venezuela (PAHO, 2001).

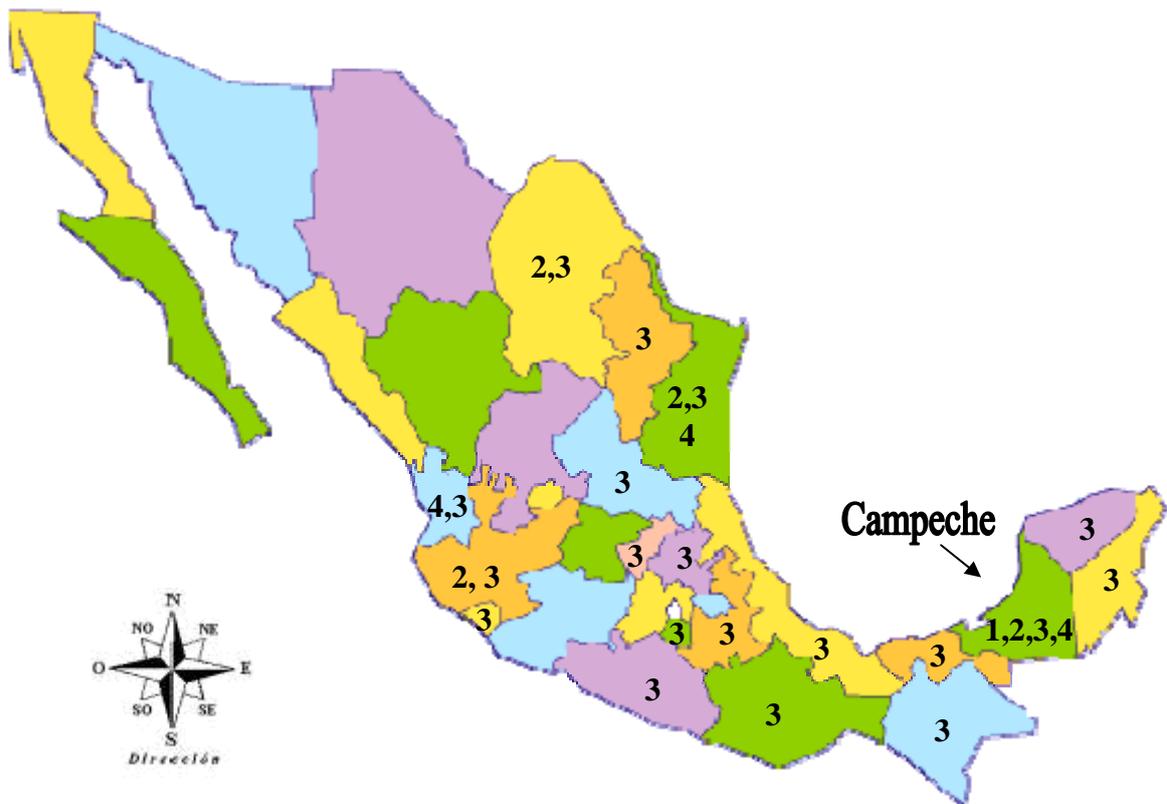


Figura 13. Circulación simultánea de los diferentes serotipos en México

Fuente: SINAVE 1998

El virus DEN-3 fue detectado en Puerto Rico en 1998 y después se extendió a otras islas del Caribe, recientemente se ha aislado en Sudamérica causando epidemias (Figuroa y Ramos, 2000; Rocco, Kavakama, Santos, 2001), y no debe descartarse la posibilidad de que a medida que el DEN-3 se disemine en el estado de Campeche, se presenten casos de FHD/SCD. La introducción de un nuevo genotipo de virus DEN-3 fue asociada con el incremento de casos de FHD/SCD en países de Latinoamérica (Usuku et al., 2001),

así como en Tailandia donde los casos de FHD por este serotipo prevalecieron en niños (Sukri et al., 2003).

Las formas graves de la enfermedad se producen mayormente en aquellas áreas en que circulan en forma sucesiva o simultánea varios serotipos del virus asociándose a una infección de tipo secundaria por un segundo serotipo infectante (Halstead, 1988). De los 10 casos cuyas muestras fueron procesadas por neutralización, únicamente uno presentó infección primaria, seis presentaron infección secundaria y tres resultaron negativos por neutralización. La elevada presencia de infección secundaria se correlaciona con el elevado porcentaje de casos de DH observada en estos pacientes 3/53 (5.7 %) similar a lo reportado por otros autores (Halstead, 1988).

Se han observado epidemias de DEN-3 asociadas o no a la presencia de casos de DH. El desarrollo de enfermos de DH depende de varios factores destacándose entre ellos el estado inmunitario de la población, la posibilidad de desarrollo de infecciones secundarias, la amplia circulación viral y la presencia de cepas de mayor virulencia (Kourí et al., 1989; Holmes y Burch, 2000; Gubler, 2002). La cepa de DEN-3 que circula actualmente en la región de las Américas, pertenece al mismo genotipo (Genotipo III) que las aisladas en la India y Sri Lanka, con capacidad de producir DH (Uzcategui et al, 2003).

El programa de erradicación del vector de dengue en el estado de Campeche se vio entorpecido y disminuido en el año 1997, lo que indudablemente contribuyó a la presencia de este brote, ya que los recursos económicos fueron canalizados a gastos electorales y políticos por las elecciones a la Gubernatura del Estado, en Julio de 1997.

IV.4. Estudiar la transmisión a virus dengue en febriles de etiología no precisada en el municipio de Campeche durante los años 1999–2000.

En el período de 1999 a 2000, un total de 1250 paciente febriles acudieron a consulta, de estos 999 (79.92%) correspondieron al sexo femenino y 251 (20.08%) fueron del sexo masculino, que acudieron a consultar a los tres hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de cada paciente se obtuvo una muestra de suero, que fueron procesadas por el método de ELISA de Captura de IgM, siguiendo el procedimiento establecido por Kuno, 1991, sistema que ha sido recomendado ampliamente como herramienta de gran utilidad en la vigilancia serológica (Gianella y cols., 1998; Kittigul et al., 1998; Loroño et al., 2004).

Un total de 40 sueros resultaron positivos (3.2%) a anticuerpos IgM, lo que se interpretó como casos de infección recientes; 25 correspondieron al sexo femenino y 15 al masculino; el rango de edad varió desde 2 a 74 años (tabla 11).

Tabla 11. Distribución por sexo y edad de los enfermos febriles con presencia de anticuerpos IgM a dengue, en el período 1999-2000

| RANGO DE EDAD | FEBRILES | POSITIVOS IgM | | % |
|---------------|----------|---------------|-----------|----------|
| | | FEMENINO | MASCULINO | |
| < 1 | 1 | - | - | 0 |
| 1 – 4 | 20 | 1 | 1 | 2(10) |
| 5 – 14 | 107 | 2 | 1 | 3(2.8) |
| 15 – 24 | 403 | 4 | 3 | 7(1.73) |
| 25 – 44 | 575 | 10 | 8 | 18(3.13) |
| 45 – 64 | 123 | 7 | 2 | 9(7.31) |
| > 64 | 21 | 1 | - | 1(4.8) |
| TOTALES | 1250 | 25 | 15 | 40(3.2) |

La infección resultó mayor en el sexo femenino y en el rango de edad de 45-64 años, resultando significativo con un valor de $P=0.004$. Estos casos (40) fueron detectados durante las semanas 36–47 que son las semanas de mayor humedad por el período de lluvias.

El 100% de los casos resultaron ser autóctonos, pues estos no refirieron haber realizado viajes recientes a otras zonas endémicas.

Durante los brotes de dengue pueden manifestarse otros procesos febriles y erróneamente clasificarlos como dengue (Bustos, Handan, Loroño, 1990; Zavala y cols., 1998; Ing-Kit, Jien-Wei, Kuender, 2005); en el presente estudio se encontró que el 19.2 % de pacientes febriles cursó con un cuadro de Salmonelosis, 66.4% cursaron con Infecciones respiratorias agudas, con Rubéola 1.6 %, Varicela 2.5 % y sin diagnóstico el 7.1 %.

Los pacientes que resultaron positivos a virus dengue, fueron visitados en sus domicilios y se les interrogó sobre su padecimiento, encontrando que 38 (95%), refirieron haber presentado manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad como fiebre 95%, cefalea 85%, dolor retroocular 72.5%, artralgias 95% y mialgias 95%, dos de ellos (5%) manifestaron haber presentado además gingivorragia y vómitos.

Desde el punto de vista clínico el síntoma principal lo constituyó la fiebre, a la que se asociaron la cefalea y el dolor osteomioarticular, hallazgo que coincide con lo notificado en Cuba y países de Latinoamérica (Ayllón et al., 1989; Rigau, 1997). En el cuadro clínico de FD se pueden observar manifestaciones hemorrágicas de tipo leve como epistaxis, gingivorragia, menorragia y petequias (Martínez, 1995). Solamente un paciente refirió haber presentado gingivorragia y petequias.

Desde el año 1989, el ELISA de Inhibición ha sido utilizado con resultados satisfactorios en la vigilancia seroepidemiológica del dengue en Cuba (Vázquez et al., 1997). Los resultados obtenidos durante años en la aplicación de este sistema a la vigilancia serológica, motivó a aplicarlo en nuestro trabajo para definir la prevalencia de anticuerpos en los pacientes febriles que asistieron a la consulta externa de tres hospitales del sector salud en un periodo de dos años.

De un total de 1 250 muestras procesadas por esta técnica, 942 resultaron positivas; de ellas, 753 mujeres (80%) y 189 (20%) hombres. El alto porcentaje de casos positivos a IgG encontrado en este estudio sugiere una elevada transmisión de dengue en el municipio de Campeche.

En este trabajo se obtuvieron resultados semejantes a los encontrados en otras áreas endémicas (Loroño et al., 1989; Graham et al., 1999), lo que hace suponer que existe una transmisión continua en el municipio de Campeche. En las zonas endémicas es imprescindible definir que tan confiable es la sintomatología sugestiva de dengue, cuando no hay evidencias de epidemia manifiesta, con el fin de validar la estrategia de vigilancia epidemiológica basada en la participación de la comunidad, que algunos autores han denominado “alerta de fiebre” (Graham et al. 1999; Condon et al., 2000), motivo por el cual se hace necesaria una determinación confiable de anticuerpos específicos de infección reciente, como son las IgM antidengue en los casos sospechosos referidos por la propia comunidad, y no solamente en aquellos captados por los servicios de salud.

La implementación de las técnicas de ELISA de captura y de inhibición, fortaleció la vigilancia serológica durante los dos años de estudio, permitiendo la detección de nuevos casos y determinar la prevalencia de anticuerpos a virus dengue en los pacientes estudiados, tal como lo han reportado otros autores (Lam y Devine, 1998; Sang, 1998; Lam et al., 2000).

Actualmente las epidemias por dengue son uno de los problemas de salud pública más importantes en la mayoría de las comunidades urbanas de los países tropicales (WHO,

2002; Liu et al., 2003; García y Rigau, 2003). Tradicionalmente se piensa que dichas epidemias inician cuando una persona infectada por un nuevo serotipo ingresa a una comunidad donde exista una elevada proporción de individuos susceptibles, iniciándose así una epidemia, que se expande en tiempo y espacio en dependencia de las acciones de control que se establezcan, así como del agotamiento de los individuos susceptibles. Con lo que sobreviene una declinación progresiva hasta su extinción o endemidad (Kuno, 1995; Teixeira et al., 2001).

El municipio de Campeche, es una zona permanentemente infestada por *Aedes aegypti* (SSA, 2001), con brotes epidémicos de dengue, siendo el más reciente el de 2002, además de que se ha documentado en este municipio la circulación de los cuatro serotipos, datos que podrían ubicarla como una zona endémica. Los resultados obtenidos en el período 1999-2000 apoyan lo anterior.

IV.5. Conocer la seroprevalencia a los virus dengue en el Estado de Campeche, en el 2002.

El estado de Campeche se encuentra conformado por 11 municipios, con una población bastante dispersa, donde la concentración mayor de población se localiza en las cabeceras municipales como Campeche (por el turismo) y Carmen donde existe una gran población flotante por cuestiones laborales (en este municipio se localizan los pozos petroleros más importantes del país), por lo que un buen número de sus habitantes no son originarios ni permanecen por más de 6 meses consecutivos en el municipio. Por lo anterior se excluyeron a aquellos individuos que no tuvieron una permanencia mayor de cinco años en el municipio de Carmen.

Son de gran interés y prioridad los estudios seroepidemiológicos retrospectivos y prospectivos que permiten determinar factores de riesgo asociados con la transmisión de dengue y el desarrollo de dengue hemorrágico.

El ELISA de IgG y la Neutralización han sido utilizados en las encuestas seroepidemiológicas realizadas en Ecuador en 1988 (Guzmán et al., 1991), y en Panamá en 1993 (Quiroz et al., 1997) para definir la prevalencia de anticuerpos a virus dengue, empleando muestras de sangre tomadas en papel filtro. En este estudio la toma de muestras en papel filtro (Nobuto) fue un medio excelente para la obtención y transporte de las mismas. Siguiendo el diseño estadístico se obtuvieron 600 muestras en total, representativas de la población del estado resultando 418 positivas por ELISA de Inhibición lo que determinó una prevalencia de anticuerpos a dengue de 70 % en el Estado de Campeche.

Resultados Similares han sido reportados en Brasil 69% (Teixeira et al., 2002b), Delhi, India 78% (Kurukumbi, Wali, Broor, 2001) y de 66% en Perú (Reiskind et al., 2001). Con respecto a la prevalencia se obtuvieron valores mayores a los de la media nacional que fue de 12.7% (SINAVE, 2002) y semejantes a los encontrados en otras áreas endémicas (Graham et al., 1999), lo que nos hace suponer una transmisión endémica en la zona.

En la figura 14 pueden observarse los resultados obtenidos en los 11 estratos (municipios) estudiados, en la que se refleja el porcentaje de positividad encontrado en los municipios del Norte (Calkiní, Tenabo y Hecelchakán), Centro (Campeche, Champotón y Hopelchén) y Sur (Carmen, Escárcega, Candelaria, Calakmul y Palizada) del estado. Los municipios con una mayor prevalencia de anticuerpos IgG fueron Calkiní, Hecelchakán, Campeche, Carmen y Champotón. Se encontró que en varias localidades de menos de 50 000 habitantes (Hampolol, Lerma, Xbacab, Hool, Pucnachen, entre otras) más del 23% presentaron anticuerpos a dengue, lo que significa que ha habido un subregistro importante, y que los casos en localidades pequeñas no se están notificando, o son asintomáticos.

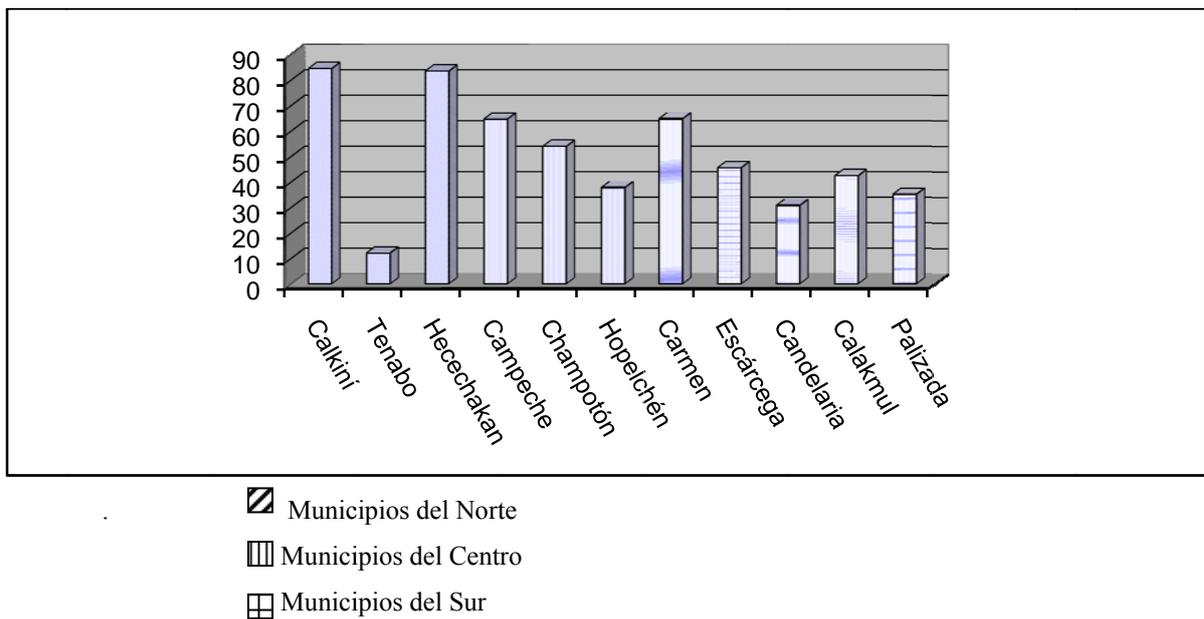


Figura 14. Porcentaje de anticuerpos IgG en los municipios del estado de Campeche.

Una gran proporción de la población adulta ha estado expuesta al dengue en el estado de Campeche, observándose que fue más elevada a mayor edad (Tabla 12).

Tabla 12. Prevalencia de anticuerpos IgG a dengue por grupos de edad, en el estado de Campeche en el año 2002.

| MEI Positivo | 0-10 % | 11-20 % | 21-30 % | 31-40 % | 41-50 % | 51-70 % |
|---------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Total 418 | 13 | 38 | 62 | 102 | 155 | 48 |
| % | 3.11 % | 9.09 % | 14.83 % | 24.40 % | 37.08 % | 11.48 % |

La prueba de neutralización es una de las técnicas más específicas, debido a que los anticuerpos neutralizantes son los que menos reacciones cruzadas producen. La clasificación de los virus del dengue en serotipos esta basada en la caracterización antigénica analizada por neutralización del virus (Russel et al., 1967; De Madrid y Poterfield, 1974; Calisher, Karabatsos, Dalrymple, 1989).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio seroepidemiológico retrospectivo a los virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4.

De las 600 muestras tomadas en total, 418 resultaron positivas por MEI y de éstas, 405 (96 %) resultaron positivas por neutralización: 131 (32.3 %) individuos tuvieron una infección primaria y 274 (67.6 %) presentaron una infección secundaria; la secuencia de infección secundaria que prevaleció (30.7%) y resultó mayor en la población del estado de Campeche fue D1-D2-D3-D4, lo que podría sugerir la permanente circulación de los virus del dengue en la región y que en el estado de Campeche el dengue es endémico. La prevalencia de infección por dengue 1 resultó la más elevada, este virus ha permanecido circulando en el estado desde el año 1980.

En la tabla 13 puede observarse la distribución de los individuos con infección primaria a los 4 virus en los municipios del estado. El dengue 4 ha tenido una circulación menor en los municipios del Sur del estado.

Tabla 13. Distribución según serotipo de dengue de los individuos con infección primaria en los municipios del estado de Campeche en el año 2002.

| MUNICIPIOS | D1 | D2 | D3 | D4 | TOTAL |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|
| CALKINI | 8 | 2 | - | - | 10 |
| HECELCHAKAN | 7 | 2 | - | 1 | 10 |
| TENABO | - | - | - | - | - |
| CAMPECHE | 30 | 4 | 5 | 7 | 46 |
| HOPELCHEN | 3 | - | - | 1 | 4 |
| CHAMPOTON | 10 | - | 1 | 1 | 12 |
| CALAKMUL | 2 | - | - | - | 2 |
| ESCARCEGA | 9 | 1 | 1 | 2 | 13 |
| CANDELARIA | 2 | 1 | - | - | 3 |
| CARMEN | 16 | 4 | 9 | 1 | 30 |
| PALIZADA | - | 1 | - | - | 1 |
| TOTAL | 87 | 15 | 16 | 13 | 131 |
| % | 66.4 | 11.5 | 12.2 | 9.9 | 100 |

Se observó un mayor número de personas con infección secundaria en la muestra estudiada de los municipios de Campeche, Carmen, Champotón, Calkiní y Escárcega. (Tabla 14). También los datos sugieren, que el virus DEN-1 empezó su circulación mas temprano, es evidente que hay circulación de los cuatro serotipos y que el DEN-1 es el virus que mas ha circulado tanto primario como secundario.

Tabla 14. Distribución según serotipos de dengue de los individuos con infección secundaria en los municipios del estado de Campeche en el año 2002.

| MUNICIPIOS | D1- D2 | D1- D3 | D2- D4 | D2- D3 | D1- D4 | D3 - D4 | D1- D2- D3 | D1- D2- D4 | D1- D3- D4 | D2- D3- D4 | D1- D2- D3-D4 | Total |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|-------|
| CALKINI | 9 | 1 | 1 | - | - | - | - | 3 | - | - | 10 | 24 |
| HECELCHAKAN | 3 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | 5 | 10 |
| TENABO | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| CAMPECHE | 6 | 18 | 1 | 3 | 9 | - | 19 | 1 | 8 | 1 | 32 | 98 |
| HOPELCHEN | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - | - | 1 | 4 |
| CHAMPOTON | - | - | - | - | 5 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 10 | 27 |
| CALAKMUL | - | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | 4 | 7 |
| ESCARCEGA | 1 | - | 1 | - | 3 | - | - | 6 | - | 1 | 4 | 16 |
| CANDELARIA | 4 | - | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - | 9 |
| CARMEN | 8 | 9 | 1 | - | 3 | - | 33 | 3 | - | - | 18 | 75 |
| PALIZADA | 2 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 3 |
| TOTAL | 33 | 28 | 6 | 3 | 20 | 2 | 65 | 15 | 14 | 4 | 84 | 274 |
| % | 12.0 | 10.2 | 2.2 | 1.1 | 7.3 | 0.7 | 23.7 | 5.5 | 5.1 | 1.5 | 30.7 | 100 |

El estudio serológico realizado sugiere que el serotipo predominante ha sido el dengue 1, este ha circulado en todos los municipios y se ha identificado con mayor frecuencia en todos los grupos etáreos; lo que sugiere que la población susceptible a dicho serotipo ha disminuido.

En Campeche, al igual que otros estados del país, el dengue constituye una enfermedad endémica en algunas zonas donde no se ha podido erradicar al vector y la importancia de su estudio se debe al nivel ascendente de casos reportados en los últimos años en los que ha habido brotes principalmente por los serotipos 3 y 2, lo cual ubica al dengue como la primera enfermedad emergente en el país (SSA, 2005; Loroño et al., 2004).

La tabla 15 muestra la distribución por edad de las personas con anticuerpos a DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. En la muestra estudiada se observó que los porcentajes de infección por DEN-1 fueron similares en la mayoría de los diferentes grupos etáreos, no resultando así para el DEN-3, donde las personas mayores de 20 años mostraron un

marcado incremento en la presencia de anticuerpos a este virus. El grupo etáreo donde se observó una mayor infección a los cuatro serotipos fue el de 21 a 30 años.

Tabla 15. Infección primaria y secundaria en los diferentes grupos etáreos.

| SEROTIPOS | 0-10 % | 11-20 % | 21-30 % | 31-40 % | 41-50 % | 51-70 % | TOTAL |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| D1 | - | 11 12.6% | 37 42.5% | 24 27.6% | 10 11.5% | 5 5.7% | 87 |
| D2 | - | 1 6.7% | 2 13.3% | 5 33.3% | 1 6.7% | 6 40% | 15 |
| D3 | 1 6.2% | 3 18.7% | 7 43.7% | 2 12.5% | 1 6.2% | 2 12.5% | 16 |
| D4 | - | 3 18.7% | 7 43.7% | 4 25% | 1 6.2% | 1 6.2% | 16 |
| D1D2 | 1 3% | 3 9% | 15 45.4% | 5 15.1% | 5 15.1% | 4 12.1% | 33 |
| D1D4 | - | - | 10 50% | 5 25% | 3 15% | 2 10% | 20 |
| D1D3 | - | 2 7.4% | 5 18.5% | 10 37% | 7 25.9% | 3 11.1% | 27 |
| D1D2D4 | - | 2 13.3% | 6 40% | 3 20% | 1 6.7% | 3 20% | 15 |
| D1D2D3 | - | 6 9.2% | 26 40% | 11 16.9% | 7 10.7% | 15 23% | 65 |
| D1D3D4 | - | 2 14.2% | 7 50% | 2 14.2% | 3 21.4% | - | 14 |
| D1D2D3D4 | - | 8 8.9% | 41 46% | 25 28% | 9 10.3% | 6 6.7% | 89 |

En el rango de 11-20 años hubo 4 niños positivos a dengue 1 (en México se considera niño a todo aquel con edad entre 0 y 12 años). La infección secundaria fue significativamente mayor que la primaria $z > z_{c99}$, siendo más frecuente la de los serotipos D1D2D3 y D1D2D3D4.

En la población del estado de Campeche, la infección tanto primaria como secundaria al virus DEN-1 fue de 350 (86,4%) personas (la más alta), seguida por 217 (53,5%) infectadas con DEN-2, 211 (52,1%) con DEN-3 y 154 (38%) con DEN-4.

Todos los serotipos han circulado en México pero los causantes de FHD/SCD fueron: el serotipo 4 en 1984, que causó una gran epidemia y la secuencia DEN1-DEN4 que provocó 9 casos de FHD en Yucatán. La circulación de los serotipos, aumenta considerablemente el riesgo de infecciones secundarias, y de casos hemorrágicos en forma de brotes y epidemias (SINAVE, 2006).

Varios autores han señalado que la infección secundaria es el principal factor de riesgo de FHD/SCD y que dicho riesgo se incrementa hasta 15 veces cuando el segundo serotipo es el dengue 2 (Halstead et al., 1988; Thein et al., 1997). Esto no se cumplió en Campeche, a pesar de la amplia circulación viral, los individuos infectados no evolucionaron hacia las formas graves de la enfermedad. Según Kourí, Guzmán, Bravo, 1987, para que se desarrolle una epidemia de FHD es necesario que concurren varios factores de riesgo del huésped, el agente y epidemiológicos; estudios recientes refieren cierta asociación genética, como en individuos tailandeses, donde se observó la correlación de los alelos HLA-A 0207 y HLA-B 51 para desarrollar FHD. En contraste los alelos HLA 0203 y el HLA-B 52 tienden a presentar FD en una infección de tipo secundaria (Stephens et al., 2002). A este respecto, en pacientes mexicanos se encontró que el alelo HLA-DR4 es un factor genético que resultó protector contra FHD, sugiriendo que los genes del complejo principal de histocompatibilidad juegan un papel importante en la susceptibilidad o resistencia para el desarrollo de FHD (LaFleur, 2002). Con respecto al agente, datos epidemiológicos moleculares han proporcionado evidencias de mayor virulencia en genotipos que podrían determinar la elevada incidencia del dengue hemorrágico en América (Rico-Hesse et al., 1997; Rothman y Ennis, 1999).

A partir del año 2000 se ha reportado el incremento de casos de FD y FHD en niños y adultos, infecciones causadas por el serotipo DEN-2, por lo que podría deberse a la introducción de un nuevo genotipo del virus DEN-2 que ha estado circulando en la región (Cisneros et al., 2006; Loroño et al., 2004; Uzcategui et al., 2001).

La elevada frecuencia de infección por los serotipos del dengue en niños y adultos nos indica la alta circulación de los virus en el Estado, siendo éste un factor epidemiológico importante para la aparición de brotes epidémicos.

En este estudio se encontró que el mayor número de individuos con anticuerpos neutralizantes a dengue fue entre las edades de 21 a 40, sin que a la fecha exista un estudio en las áreas endémicas del país que evalúe el efecto económico de la atención de los casos y, menos aún, de lo que representaría la atención de casos de FHD. Dicha estimación resulta relevante al considerar los resultados de los estudios realizados en Tailandia en 1981, en los que se calcularon los costos de la atención de la epidemia de FHD en aproximadamente 6.8 millones de dólares, mientras que en la epidemia de Cuba en 1997 el costo estimado fue de 103 millones de dólares (PAHO, 2002). Cifras de tal magnitud ponen de relieve el impacto social y económico que tendría para el estado la aparición de una epidemia de esta naturaleza y lo imperativo que resulta fortalecer los programas de vigilancia, prevención y control.

El riesgo se hace manifiesto con la circulación de los cuatro serotipos y la existencia adicional de un vector potencial el *Aedes albopictus* en estados vecinos.

Capítulo V. Conclusiones

- Se observó una mayor incidencia de casos de dengue en los años 1994, 2000, 2002 y 2005. En los últimos cinco años se detectó un incremento de casos de FHD.
- El cuadro clínico del dengue en el estado de Campeche fue predominantemente del tipo benigno, los casos graves se han presentado en forma esporádica y la mayoría ha evolucionado satisfactoriamente.
- Se determinó que el grupo de edad más afectado fue el de 15 a 44 años, con un ligero predominio del sexo femenino.
- Se demostró la infección por virus dengue en escolares que cursaron asintomáticos, resultando relevante la asociación del período de lluvias con la transmisión de la enfermedad.
- Se demostró en el brote de dengue ocurrido en un área rural del estado de Campeche, la presencia de pacientes con manifestaciones hemorrágicas, que podría asociarse posiblemente a la introducción de un nuevo serotipo y la presencia de individuos con infección secundaria a dengue.
- Las manifestaciones hemorrágicas se vieron relacionadas con la introducción de un nuevo serotipo, como fue la introducción del serotipo 3 en el año 1997, en el que toda la población era susceptible al mismo; así como la presencia de infecciones secundarias.
- La vigilancia serológica establecida permitió demostrar la transmisión del dengue durante los años 1999-2000, en el municipio de Campeche.
- Se detectó la circulación de los cuatro serotipos del dengue en el estado de Campeche, encontrándose que el serotipo DEN-1 fue el que predominó.

- La elevada circulación de los virus de dengue en el estado de Campeche demuestra hasta el presente año, una transmisión en ascenso, que pudiera traducirse en un riesgo inminente de epidemia en la península de Yucatán.

Capítulo VI. Recomendaciones.

- Fortalecer la vigilancia clínico-epidemiológica y de laboratorio en el estado de Campeche.

- Realizar aislamiento y caracterización genética de los virus del dengue que estén circulando en el Estado, con el objeto de alertar a las autoridades de salud sobre la entrada de un nuevo genotipo o si se trata de un genotipo con potencialidad de desarrollo de FHD/SCD.

- Profundizar en el estudio de los factores de riesgo de la FHD/SCD relacionados a la genética del individuo y la infección secundaria por dengue.

Capítulo VII. Referencias Bibliográficas.

VIII.1. Bibliografía

- Alvarez M, Rodriguez RR, Bernardo L, Morier L, Guzmán MG. Improved dengue virus plaque formation on BHK 21 and LLCMK₂ cells: evaluation of some factors. *Dengue Bulletin* 2005; 29:1-9.
- Armada JA, Figueredo R. Application of environmental management principles in the program for eradication of *Aedes aegypti*. (Linnaeus-17620) in the Republic of Cuba-1984). *Bull Pan Am Health Org* 1986;20:186-93.
- Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation and apoptosis. *J Immunol.* 1998;161:6338-46.
- Ayllón L, Martínez E, Kourí G, Guzmán MG, Paradoa M. Factores del huésped en la fiebre hemorrágica dengue-síndrome de shock por dengue (FHD/SSD) en el niño. *Rev Cubana Pediatr.* 1989;61(4):498-517.
- Balmaceda A. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico del dengue: programa de reconstrucción pos-huracanes George y Mitch. Washington, DC.: OPS; 2002.
- Barbosa de Silva J, Sigueirs JB, Coelho GE. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull.* 2002;23:3-6.
- Barrera R, Delgado N, Jimenez M, Valero S. Eco-epidemiological factors associated with hyperendemic dengue haemorrhagic fever in Maracay City, Venezuela. *Dengue Bull.* 2002;26:84-92.
- Bielefeldt-Ohmann H. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res.* 1998;57:63-79.
- Blok J, Gibbs AJ. Molecular systematic of the flavivirus and their relatives. En: Calisher C, Gibbs AJ, Garcia-Arenal F, editores. *Molecular basis of viral evolution.* Cambridge; 1995.
- Boletín de Epidemiología de la Secretaría de Salud del Estado de Campeche. 2005.
- Bol. of Sanit Pan 1985. Programas para el control del *Aedes aegypti*.

- Bray M, Ruhge M, Issei T, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. *J Virol* 1998;72:1647-51.
- Briseño B, Gomes H, Argott E, Montesano R. Potential Risk for Dengue Hemorrhagic Fever : the isolation of serotype dengue 3 in México. *Emerging Infectious Diseases* 1996;2:133-135.
- Burke DS, Monath TP. Propagation and Assay in Cell Culture. En Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martín MA, Roizman B, Straus SE, editores. *Virology*, Vol. 1, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001; 1054-1059.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE. A prospective study of dengue infection in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38:172-80.
- Bustamante M. La fiebre Amarilla en México y su origen en América 1958. *Ensayos sobre la historia de las epidemias en México*, IMSS, 1982; 1:19-36.
- Bustos J, Hamdan A, Loroño MA. Serologically proven acute rubella infection in patients with clinical diagnosis of dengue. *Epidemiol Infect* 1990;104:297-302.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationship between flavivirus as determined by cross-neutralization test with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989;70:37-43.
- Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identify? *Hist Med* 1971;26:243-62.
- Casey HL. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro-test. *Public Health Monograph* 74. U. S. Government. Printing office. Washinton, D. C. 1965.
- Castillo-Salgado D. Health situation analysis in the Americas, 1999-2000. *Epidemiological Bulletin* 2000; 21(4):1-3.
- Center for Diseases Control 2004.
- Chakravarti A, Gur R, Berry N, Mathur MD. Evaluation of three commercially available Kits for serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2000; 36: 273-74.
- Chang GF. Molecular biology of dengue viruses, p. 175-198. Gubler and G. Kuno (eds). *In Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CAB INTERNATIONAL, New York; 1997.

- Chen WJ, Chen SL, Chien LJ, Chen CC, Harn MR et al. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:12-16.
- Chungue E, Cassar O, Drouet MT, Guzmán MG, Laille M, Rosen L, Deubel V. Molecular epidemiology of dengue 1 and dengue 4 viruses. *J Gen Virol* 1995;76:1877-84.
- Cisneros A, Díaz A, Cruz G, Tovar R, Ramírez L, Jiménez F, Black W, Muñoz L. Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Arch Virol* 2006;151:113-125.
- Clark G. Situación epidemiológica del dengue en América. Desafíos para su vigilancia y control. *Rev Salud Pública de México* 1995; 7:5-11.
- Clark DH, Cassals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7:561-73.
- Clark, T. Dengue virus: break-bone fever. 2002; 416:672-674.
- Condon R, Taleo G, Stewart T, Sweeney T, Kiedrzyński T. Dengue surveillance in the Pacific Islands. *Pac Health Dialog* 2000;10:6-12.
- Cui T, Sugrue R, Xu Q, Lee A K. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 1998;246:409-417.
- Cussubo AJ, Vaughn DW, Nisalak A. Comparison of PanBio dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and Venture Technologies Dengue IgM and IgG Dot Blot. *J Clin Virol* 2000;16:135-144.
- Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanaroj S, Aaskovj. Comparison of PanBio dengue duo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) And MRL dengue fever virus immunoglobulin M capture ELISA for diagnosis of dengue virus infectious in Southeast Asia. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(5):705-712.
- Daniel W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Noriega Editores. Determinación del tamaño de la muestra para estimar proporciones. 3ra.Edición México:1999. p 202-204.
- De la Fuente V. Monografía del dengue, la fiebre hemorrágica del dengue y los mosquitos vectores. Editorial JR Mex. 1986.p 51-52.
- De Madrid R, Porterfield JS. The flaviviruses (group B arboviruses) a cross-neutralization study. *J Gen Virol*. 1974;23:91-96.

- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of dengue infection in human cell by alpha, beta and gamma interferons. *J Virol* 2000;74:4957-4966.
- Díaz FJ, Farfán AJ, Olson KE, Loroño MA, Gubler DJ. Genetic variation within the premembrane coding region of dengue viruses from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hig* 2002; 67:93-101.
- Dietz V, Gubler DJ, Ortiz S, Kuno G, Castavelez A, Sather GE. The 1986 dengue and dengue haemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiological and clinical observations. *Health Sci J* 1996; 3:201-10.
- Downie N, Heath R. *Basic Estatistical Methods*. Harper & Row, Publishers. Sample. Tirth edition New York 1982. p171-180.
- Durbin A, Karron R, Sun W, Vaughn S, Reynolds M. A live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in humans. *Am J Trop Med Hyg* 2002;65:405-13.
- Epidemiologic Department, Ministry of public Health, Thailand 1998.
- Espinosa F, Hernández CM, Rendón R, Carrillo ML, Flores JC. Transmisión interepidémica del dengue en la ciudad de Colima, México. *Salud Pública Méx* 2003;45(5):356-370.
- Figueiredo LT, Cavalcante SM, Simoes MC. Dengue survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Orgam* 1990;24(2):217-25.
- Figueroa R, Ramos C. Dengue virus serotype 3 circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res* 2000; 31:429-30.
- Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, Daniels E. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(1):11-18.
- García E, Rigau J. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. *Pan Am J Public Health* 2003;13:362-368.
- García M, Cabezas C, Callahan J, Yana B, Ortiz A, Anaya E. Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el virus dengue, en muestras obtenidas en papel filtro. *Rev Perú Med exp. Salud pública* 1997.

- Gianella A, Pirard M, Holzman A, Boelaert M, Fernández F, Peredo C, Pelegrino JL. Brote epidémico de dengue virus 2, genotipo Jamaica, en Bolivia. *Salud Pública de México* 1998;40(6):469-473.
- Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *Clinical review* 2002;321:1563-1566.
- Gómez H, Koopman S, Addy C, Zárate A, Vaca-Marín M, Longini M. Dengue outbreaks in the Pacific COSAT of Mexico. *Int J Epidemiol* 1988a;17:178-186.
- Gómez H, Rodríguez H. El dengue y la fiebre hemorrágica del dengue: clínica y epidemiología. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica* 2000b;B-5:1-40.
- Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I, studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:412-419.
- Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Rev Entomol* 1999; 44:51-75.
- Green S, Vaughn D, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 1999; 59:329-334.
- Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien R, Deubel V, Vordman V, et al. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection. *Adv Virus Res* 1999; 53:35-70.
- Gu B, Liu G, Lin-Goerke J, Maley D, Gutshall L. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol* 2000;74:1794-1800.
- Gubler DJ, Clark G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases* 1995; 1:55-57.
- Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Saroso J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. Virological and Epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 701-710.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends microbial.*2002;2:100-3.

- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbio Rev* 1998; 11: 480-496.
- Gubler DJ. Population growth urbanization, automobiles and aeroplanes: the dengue connection. *New and resurgent infections. Prediction, detection and management of Tomorrow's Epidemics*. Edited by B. Greenwood and K. de Cock. Published. John Wiley & Sons Ltd: 1998.
- Guirakhoo F, Weltzin T, Chambers Z, Zhang K, Monath. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in no human primates. *J. Virol* 2000;74:5477-5485.
- Guzmán MG, Kourí G, et al. Encuesta Nacional a virus dengue, Cuba 1982. *Rev Cub Med Trop* 1984; 36(2):124-131.
- Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Martínez E. Sequential Infection as risk factor for Dengue Hemorrhagic Fever/ Dengue Shock Syndrome (DFH/DSS) during the 1981 Dengue Hemorrhagic Cuban Epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 367.
- Guzmán MG, Kourí G, Advances in Dengue Diagnosis. *Clin Diag Lab Immunol* 1996; 3: 621-27.
- Guzman MG, Kourí G, Vasquez S, Rosario D. DFH Epidemic in Cuba, 1981 and 1997: Some Interesting Observations. *Dengue Bulletin* 1999a; 23:39-43.
- Guzmán MG, Kourí G, Bravo J. La emergencia de la fiebre Hemorrágica del dengue en las Américas. *Reemergencia del dengue. Rev Cubana Med Trop* 1999b;51(1):5-13.
- Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Alvarez M, Vázquez S, Delgado I, Halstead SB. Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000; 152(9):793-99.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 2002 b;_2:33-42.
- Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology* 2003a;27:1-13
- Guzmán MG, Balmaseda A, Hammond S, Robleto G, Flores C, Téllez Y, Videá E, Saborio S, Pérez L. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diag Lab Immu* 2003b;10:317-322.

- Guzmán MG. Avances en el diagnóstico del dengue exposiciones de Taller Dengue en la UCV. Temas para el médico.[en línea] 2004 disponible en <http://www.reinaldogodoyeditor.com/subpaginas/tallerdengue.htm>.
- Hales S, Weinstein P, Souares Y, Woodward A. El niño and the dynamics of vector borne disease transmission. *Environ Health Perspect* 1999;107:99-102.
- Halstead SB Pathogenesis of dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* 1988; 239:476-481.
- Halstead SB, Dengue haemorrhagic a public health problem and field for research. *Bull WHO* 1980; 58: 1-21.
- Halstead SB, Pathophysiology and pathogenesis of dengue hemorrhagic fever, In: Thongcharoen P, editor. World Health Organization, regional publication SEARO. No. 22 1993:80-103.
- Harris E, Rogers G, Smith L, Selle J, Kramer L, Valle S. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2643-9.
- Heinz F, Stiasny K, Puschner-Auer G, Holzmann H, Allison S. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 1994; 198:109-117.
- Herrera B, Prevots DR, Zarate ML, Silva JL, Sepúlveda J. First reported outbreak of classical dengue fever at 1700 meters above sea level in Guerrero State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:649-653.
- Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* 2000;74:74-77.
- Huang JH, Wey JJ, Sun YC, Chin C, Chien LJ, Wu YC. Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1999; 57:1-8.
- Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Li YL, Shaio MF. High-level expression of recombinant dengue viral NS1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol* 2001;65:553-560.
- Hundt A. Impact of tourism development on the economy and health of Third World Nations. *J Travel Med* 1996; 3:107-12.
- Ibañez BS, Gómez DH. Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. *Sal púb de Méx* 1995; 37: 555-602.

- Ibraim NM, Cheong I. Adult dengue haemorrhagic fever at Kuala Lumpur Hospital: retrospective study of 102 cases. *Br J Clin Pract* 1995; 49(4):189-91.
- Ing-Kit Lee, Jien-wei Liu, Kuender D. Yang. Clinical Characteristics and Risk Factors for Concurrent Bacteremia in Adults With Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005;72:221-226.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Sistema para la consulta de información censal 2000 México.
- Isturiz RE, Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect Dis Clinics North Am* 2000. 14:121-140
- Janssen HL, Bienfait HP, Jansen CL, VanDuinen SG, Vriesendorp R. Schimsheimer RJ. Fatal cerebral edema associated with primary dengue infection. *J Infect* 1998; 36(3): 344-6.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997; 176(2): 313-21.
- Kanesa-thasan N, Chang GJ, Smoak BL, Magill A, Burrous MJ, Hoke CH. Molecular and epidemiologic analysis of dengue virus isolates from Somalia. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(2):299-303.
- Kane-thasan N, Sun G, Kim-Ahn S, Van J, Putnak A. Safety and immunogenicity if attenuated dengue virus vaccine (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 2001;19:3179-3188.
- King A, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint K, Pattanapanyasat K. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30:718-728.
- Kittigul L, Suthachana S, Kittigul C, Pengruangrojanachai V. Immunoglobulin M-capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(3): 352-6.
- Kittigul L, Temprom W, Surirarat D, Kittigul C. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue infected patients by biting-streptavidin enzima-liked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 2000; 90:51-7.
- Koraka P, Suharti C, Setiati T, Mairuhu A, Gorp E, Hack C, Sutaryo J, Vandermer G, Groen J. Kinetics of dengue virus-specific serum

immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4332-4338.

- Kourí G, Guzmán MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? II, An integral analysis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1987;81: 821-3.
- Kourí G, Guzmán MG, Bravo J, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic 1981. *Bull World Health Org* 1989; 67: 375-80.
- Kourí G, Valdéz M, Arguello L, Guzmán MG, Valdés L, Soler M, Bravo J. Epidemia de dengue en Nicaragua 1985. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 33(5):365-371.
- Kreil TR, Eibl MM. Nitric oxide and viral infection: no activity against a Flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. *Virology* 1996;219:304-306.
- Kuhn J, Zhang W, Rossman G, Pletnev V, Corver J, Lenches E. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell* 2002;108:717-725.
- Kumate J. Dengue clásico y dengue hemorrágico en México. *Gaceta Médica Mexicana* 1989; 125: 37-39.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infection. *J Virol Meth* 1991;33:101-13.
- Kuno G, Croop CB, Wong LJ, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(5):757-62.
- Kuno G. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiol Rev* 1995; 17:321-35.
- Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gagnon SJ, Janus J, et al. Immunopathologic mechanism of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol* 1994;9:59-64.
- Kurane I, Ennis F. Immunopathogenesis of dengue virus infections. Ed. *Cab. International* 1997:273-290.
- Kurukumbi M, Wali J, Broor S. Seroepidemiology and active surveillance of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Delhi. *Indian Journal of Medical Sciences* 2001;55:149-156.
- LaFleur C, Granados J, Vargas A, Ruiz M, Villareal G, Higuera L. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-

- DR4 as a posible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology* 2002;63:1039-1044.
- Lam SK, Devine PL. Evaluation of capture Elisa and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Virol* 1998;10(1): 75-81.
 - Lam S, Lan E, Mitchell JL, Cuzubo AJ, Devine PL. Evaluation of a capture screening enzyme-linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:850-852.
 - Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses. *J Gen Virol* 1994;75:65-75.
 - Lei HY, E eh TM, Chen SH. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001;18:377-388.
 - Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Chacon IV, Ramos C. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73:4738-4747.
 - Lin Y, Wang K, Lei H. Virus Replication and Cytokine Production in Dengue Virus-Infected Human B Lymphocytes. *Journal of Virology* 2002; 76(23):12242-12249.
 - Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. En Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martín MA, Roizman B, Straus SE, editores. *Virology*, Vol. 1 Fourth Edition, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001; P. 991-1041.
 - Liu J, Khor B, Lee C, Lee I, Chen R, Yang K. Dengue hemorrhagic fever in Taiwan. *Dengue Bull* 2003;27:19-23.
 - Lohr SL. Sampling: Muestreo Estratificado. En *Desing and Análisis*. Thompson editores. México; 2000. P. 93-95.
 - Loroño MA, Farfan A, Rosado E, Arjona A, Flores L, Manzano L, Zavala J. Prevalencia de anticuerpos contra virus dengue en Yucatán, México. *Rev Latinoam Microb* 1989;31(4):259-262.
 - Loroño MA, Farfán JA, Zapata A, Rosado E, Flores L. Introduction of the American/Asian Genotype of Dengue 2 Virus into the Yucatán State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(4):485-492.

- Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 2002; 47:233-266.
- Mackenzi JM, Jones MK, Westaway EG. Markers for trans Golgi membranes and intermediate comparative localize to induced membranes with distinct replication functions in Flavivirus-infected cells. *J Virol* 1999;73:9555-67.
- Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V. Infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis* 1998;178(5):1270-8.
- Martínez E. Dengue y dengue hemorrágico: aspectos clínicos. *Salud Pública Mexicana* 1995; 37 supl:29-44.
- Martínez E, Guzmán MG, Valdés M, Soler M, Kourí G. Fiebre del dengue y dengue hemorrágico en infantes con infección primaria. *Rev Cubana Med Trop* 1993; 45(2):97-101.
- Mattingly PF. Taxonomy of *Aedes aegypti* and related species. WHO, Bull 1967;36: 552-554.
- Meltzer M, Rigau-Pérez J, Clark G. Using Dalys to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998:1984-1994.
- Monath TP, Burke DS. Flaviviruses. En: Fields DN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martín MA, Roizman B, Straus SE, editores. *Virology*, Vol. 1, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001. P. 1043-1089.
- Monath TP. Early indicators in acute dengue infection. *Lancet* 1997; 350(9093):1719-20.
- Monrroy V, Ruiz B. Participation of the Dengue Virus in the Fibrinolytic Process. *Virus Genes* 2000;21(3):197-208.
- Moraes L, Baeta S, Costa M. Encuesta serológica sobre el dengue entre escolares de Río de Janeiro, Brasil 1986 y 1987. *Bol of Sanit Panam* 1991; 111(6):525-32.
- Morens MD, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Rayboume N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells. Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22(2):250-4.

- Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration and magnitude of viremia in children hospitalized during the 1996-1997 Dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol* 2000;60:432-38.
- Narro J, Gómez H. El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública Méx* 1995;37 supl:12-20.
- Nawa M, Takasaky T, Yamada KI, Akatsuka T, Kurane I. Development of dengue IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods* 2001;92:65-72.
- Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol* 1997; 148(4):273-7.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) Dengue/DHF. Situación of Dengue/Dengue Haemorrhagi Fever in the South-East Asia Region. WHO Regional Office for South-East Asia; 2004.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Programa de enfermedades transmisibles. Dengue en Costa Rica y Panamá. *Bol Epid OPS* 1994.15:9-10.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guías para la prevención y el control. OPS. Washington DC; 1995. Publicación Científica; 548.
- Orta H, Mercado R, Elizondo J. Distribución de *Aedes albopictus* en Nuevo León, México, 2001-2004. *Rev Salud Pública de México* 2005;47(2):163-165.
- Palmer D, Whales C. Complement Fixation test En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of clinical laboratories immunology*. New York. Am Soc Microbiol 1986:57-66.
- Pan American Health Organization (PAHO). Guide for Diagnosis, Treatment and control of dengue haemorrhagic fever for the South East Asian and Westerns Pacific Region, Ginebra 1980:7.
- Pan American Health Organization (PAHO). 1999.
- Pan American Health Organization (PAHO). Dengue in Central America: the epidemics of 2000. *Epidemiological Bulletin* 2000;21(4):4-8.
- Pan American Health Organization (PAHO). Dengue & dengue haemorrhagic fever-2002: Number of reported cases.

- Pan American Health Organization (PAHO). Expertos analizan la carga social, económica y epidemiológica del dengue 2002. URL disponible en www.paho.org.
- Pinheiro FP. Los programas de erradicación y de control del *Aedes aegypti* en las Américas. OPS/HCP/HCT/96.63, 1996.
- Pinheiro EP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Statistics Quarterly* 1997; 50(3-4):161-69.
- Polit DF. Investigación científica en ciencias de la salud. Diseños de muestreo. Quinta edición México. Editorial McGraw-Hill Interamericana 1997:235-245.
- Quiroz E, Ortega M, Guzman MG, Vázquez S, Pelegrino JL, Campos C, et al. Dengue en Panamá, 1993. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(2):86-93.
- Ramos C. Casos de dengue en las Américas 1986-1987. *Rev. Infect.* 1988; 7:333-341.
- Ramos C, Ramón J, Mota G, Sánchez D, Hernández R, Figueroa M, Acosta H. Dengue Hemorrágico en México: un problema emergente de salud pública. En primera reunión de la rama de bioquímica y biología molecular de virus. Soc. Mex de Bioquímica. Oaxtepec, Morelos 1998:11.
- Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5a/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998;72:6199-6206.
- Reiskind M, Baisley K, Calampa C, Sharp T, Watts D, Wilson M. Epidemiological and ecological characteristics of past dengue virus infection in Santa Clara, Perú. *Tropical Medicine and International Health* 2001;6:212-218.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG. Short report: Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:177-179.
- Reiter P, Gubler DJ. Surveillance and control of urban dengue vectors. En Gubler DJ, Kuno G editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Cab International; 1997.P.425-62
- Rice CM. Flaviviridae. The viruses and their replication. En Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martín MA, Roizman B,

Straus SE, editores. *Virology*, Vol. 1, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001. P. 991-04.

- Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of Dengue Type 2 Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997;230:244-51.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and type 2 in nature. *Virology* 1990;174:479-493.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A. Origins of dengue type 2 viuses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virol* 1997; 230:244-251.
- Rigau-Pérez JC. Puerto Rico Association of Epidemiologists: Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. *Rev Panam Salud Pública* 1997;1:381-388.
- Rigau-Pérez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos,1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(2):272-4.
- Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001;43:55-7.
- Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-relationships, p. 45-60. D. J. Gubler and G. Kuno, (eds). In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB INTERNATIONAL. USA. 1997.
- Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kourí G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C636/HT cells. *J Clin microbiol* 2000;38(9):3508-10.
- Rodríguez CR. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev Cubana Med Trop*. 2002; 54(3):189-01.
- Rosario D, Alvarez M, Díaz J, Contreras R, Rodríguez R, Vázquez S, Guzmán MG. Polymerase Chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples. *Rev Panam Sal Pub* 1998; 4(1):1-5.
- Rosen L. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:642-653.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virol* 1999;257:1-6.

- Ruiz BH, Zamora MP, Liu S. Detection of dengue viral RNA by microplate hybridization. *J Virol Methods* 1995; 54(2-3):97-108.
- Rush AB. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. *Medical Inquiries and observations*. Pichard Hall, Philadelphia 1789; 104-17.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol* 1967;99:285-90.
- Salas RA, Tovar D, Barreto A. Serotypes and genotypes of dengue virus circulating in Venezuela, 1990-1997. *Acta Cient Venez* 1998; 49 (Suppl 1):33-37.
- Sang CT, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Evaluation of a commercial capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(1):7-10.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120(5):653-69.
- Secretaría de Salud del estado de Campeche. 1983.
- Secretaría de Salud de México. Dirección general de epidemiología 1986.
- Secretaría de Salud del estado de Campeche. Boletín de epidemiología 1996.
- Secretaría de Salud. Monografía del dengue, la fiebre hemorrágica del dengue y los mosquitos vectores. 1997:32.
- Secretaria de Salud del estado de Campeche. Boletín de Epidemiología 1998.
- Secretaría de salud del estado de Campeche. Boletín de epidemiología 2000.
- Secretaría de Salud del Estado de Campeche. Dirección general de epidemiología Sistema único de información y vigilancia 2001.
- Secretaria de Salud. Reporte de dengue en México. Dirección general de epidemiología 2005.
- Shuenn LW, Grouard V, Sun W, Mascola J, Brachtel E, Putvatana R, Louder M, Filgueira L, Hayes C, Frankel S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 2000;6:816-820.
- Shu P, Chen L, Chang S, Su C, Chien L, Chin C, Yung H, Huang J. Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein

- NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 2004;42:2489-2494.
- Siler JF, Hall MW, Kitchens AP. Dengue: its history, epidemiology mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J Sci* 1926;29:1-304.
 - Simmons M, Murphy GS, Hayes GC. Short report: antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:159-161.
 - Singh J, Khare S, Prabha S, Chandra R, Jain D, Bhatia R, Sokhey J. Transplacental transfer of measles antibody in Delhi. *Indian Pediatr* 1998;35:1187-1191.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) Noviembre 1998.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) Diciembre 2002.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) Septiembre 2003.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) Octubre 2004.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) 2005.
 - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) Enero 2006.
 - Solomon T, Dung NM, Baughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000;355:1053-59.
 - Soper FL. Dynamics of *Aedes aegypti* distribution and density, seasonal fluctuations in the Americas. *WHO. Bull.* 1967;36:536-538.
 - Stephens H, Klaytong R, Sirikong M, Vaughn D, Green S, Kalayanarooj S, Endy T. HLA-A and B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic thais. *Tissue antigens* 2002;60:309-315.
 - Suchitra N. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis and management. En: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, Gubler DJ, Kuno G, editors. CABI publishing, USA; 2001. P.133-144.
 - Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H. Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2001;63:29-34.
 - Sukri N, Laras K, Wandura T, Larasati R, Rachdyatmaka J, Osok S. Transmission of Epidemic Dengue Hemorrhagic Fever In Easternmost Indonesia. *Am J Trop Med. Hyg* 2003;68(5):529-535.

- Tan R, Kurniawan H, Hartati S, Widjaja S, Jennings GB,. Comparative sensitive of laboratory methods to diagnose dengue virus infections at Husada Hospital, Jakarta. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994; 25(2):262-5.
- Tassaneetrithep B, Burgess H, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J. Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 197:823-829.
- Teixeira MG, Costa MC, Barreto ML, Barreto FR. Epidemiology of dengue in Salvador- Bahia 1995-1999. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:269-274.
- Teixeira MG, Barreto ML. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Tropical Medicine and International Health* 2002a;7:757-762.
- Teixeira MG, Nascimento MC, Guerra Z, Lima M. Dengue in Brazil: Situation-2001 and Trends. *Dengue Bulletin* 2002b;26:70-76.
- Thant KZ, Morita K, Igarashi A. Detection of the disease severity-related molecular differences among new Thai dengue-2 isolates in 1993, based on their structural proteins and major non structural protein NS1 sequences. *Microbiol Immunol* 1996; 40(3):205-16.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye KM, Aaskov J. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(5):566-72.
- Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, Thant KZ. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2,3 and 4 by dengue 1. *Emerg Infect Dis* 2004;10:593-597.
- Torres J, Torres JR, Torres CG. Dengue in Latin America-A Unique Situation. *Dengue Bulletin* 2002; 26:62-69.
- Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol* 2001; 146:1381-1390.
- Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Caballero de Quintana M; Molecular epidemiology of dengue virus 3 in Venezuela. *J Gen Virol*; 2003; 84: 1567-75.
- Uzcategui N, Camacho D, Comach G, Holmes E, Gould E. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol* 2001;82:2945-2953.

- Valdés L, Guzmán MG, Kourí G, Delgado J, Carbonel I, Cabrera MV, Rosario D, Vázquez S. La Epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Rev Pan Salud* 1999;6(1):16-25
- Vasconcelos PF, Travassos D, Coelho IC, Meneses DB, Rodríguez SG. Involment of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza Ceara, Brazil. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 1998;40(1):35-9.
- Vaughan HE, George A, Morris-Glasgow V, Campione-Picardo J. Molecular diagnosis of dengue by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *West Indian med J* 1999;48(3):118-122.
- Vaughn D, Green S. Dengue viremia titer antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181:2-9.
- Vázquez S, Bravo J, Pérez AB, Guzmán MG. ELISA de inhibición. Una alternativa en el estudio serológico de los casos de dengue. *Bol Epidem OPS* 1997;18(2):7-8.
- Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Detection of IgM against the dengue virus in whole blood absorbed on filter paper. *Rev Panam Salud Publica* 1998;3(3):174-8.
- Vázquez S, Cabezas S, Pérez A.B, Pupo M, Ruiz D. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine, samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *International Journal of Infectious Diseases* 2007;11:256-262.
- Vorndam V, Nogueira RM, Trent DW. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol* 1994;136(1-2): 191-6.
- Watana V, Endy T, Samakoses R, Kerdpnich A, Simasathien S, Polprasert N, Aree C, Vaughn D, Ho C, Nisalak A. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):123-128.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999; 354:1431-1434.
- WHO. World Health Organization. Dengue Haemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control, 2nd edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997:34-47.

- WHO Dengue and dengue Hemorrhagic fever. Geneva 2002:117.
- WHO. Dengue outbreaks. Communicable Dis surveillance and response. 1998a.
- WHO. Division of control of tropical disease. Dengue and DHF control. 1998b.
- WHO. Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Ginebra: WHO/CDS/CSR/ISR/, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2000a.
- WHO. Scientific Working group on dengue. Meeting report, Geneva, Switzerland, April 2000. Geneva:WHO, 2000b.
- Wilder A, Foo W, Earnest A, Sremulanathan S, Paton N. Seroepidemiology of dengue in the adult population of Singapore. *Tropical Medicine and International Health* 2004;9:305-308.
- Wilson M, Chen L. Dengue in the Americas. *Dengue Bulletin* 2002;26:44-58.
- Winch P, Lloyd L, Daltabuit-Godas M, Kendall C. Beliefs about the prevention of dengue and other febrile illnesses in Mérida, Mexico. *J Trop Med Hyg* 1991;94:377-387.
- Wittke V, Robb T, Thu H, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002;30:148-156.
- Woodring JL, Higgs S, Beaty B. Natural cycles of vector-borne pathogens, En Beaty J, Marquadt W, Ed. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, 1996.
- Wu L, Shuenn-J, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola R, Putvatana R. Human Skin Langerhans Cells are Targets of dengue virus infection. *Nature Med* 2000; 6:816-20.
- Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, Henschel EA, Porter KR. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(4):452-7.
- Zagne SMO, Alves VGF, Nogueira RMR. Dengue haemorrhagic fever in the estate of Rio de Janeiro, Brazil: A study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:667-679.

Zavala VJ, Vado SI, Rodríguez FM, Rodríguez AE, Barrera PM, Guzmán ME.
Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán.
Rev Biomed 1998;9:78-83.