

*Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*

*Departamento de Virología*

*Estudios sobre el diagnóstico, la  
respuesta inmune humoral en humanos y la  
evaluación de la  
proteína prM como inmunógeno del virus  
dengue.*

*Trabajo en Opción al Grado de Doctor en Ciencias*

*Autor: Susana Vázquez Ramudo*

*Doctor en Ciencias Médicas*

*Ciudad de la Habana*

*2009*

## **RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES CIENTÍFICAS, DE SERVICIO Y DOCENTES DE LA AUTORA EN SU TRAYECTORIA PROFESIONAL**

Las actividades de investigación llevadas a cabo por la autora están reflejadas en diferentes tareas dentro de la temática de los Arbovirus, principalmente en dengue. Los resultados de su trabajo se muestran en un total de 108 publicaciones y reportes cortos nacionales e internacionales, como autor o coautor, relacionados especialmente con el dengue y el dengue hemorrágico, así como en la presentación de más de 100 trabajos en congresos y encuentros científicos nacionales e internacionales. Parte de estos estudios dieron lugar a tres (3) patentes, siendo la autora principal de una de ellas.

Dentro de las actividades y responsabilidades principales que asume en el laboratorio de Arbovirus, como Laboratorio Nacional de Referencia para la vigilancia y diagnóstico del dengue, se encuentra la vigilancia serológica en la cual desarrolla un papel fundamental por la importancia que tiene la detección temprana y control de esta enfermedad para el país. También es responsable de la producción de biológicos y el control de la calidad de los reactivos que se utilizan para el diagnóstico serológico del dengue.

Ha participado en la educación de alumnos tanto de pre-grado como de post-grado. Profesora en las Maestrías de Virología, Epidemiología e Infectología. Ha impartido docencia a Residentes de Microbiología, Epidemiología, Inmunología, alumnos de la Facultad de Biología, en cursos nacionales e internacionales, entrenamientos a profesionales y técnicos nacionales y extranjeros. Los resultados de su trabajo también se ven expresados en su actividad como tutora o asesora de estudiantes de diploma (12), de maestría (11), de especialista de 1er grado en microbiología (4) y de doctorado (5), para un total de 32 tesis. Ha participado activamente en más de treinta tribunales de pre-defensa y defensa de tesis de doctorado, de maestrías, de residentes y de diploma.

Como especialista del Centro Colaborador OMS/OPS ha brindado asesoría y participado como conferencista invitado en diferentes países de la región. Ha recibido varios reconocimientos, premios y menciones otorgados por la Academia de Ciencia de Cuba, por el Ministerio de Salud Pública, por el Forum de Ciencia y Técnica y por el Instituto "Pedro Kourí". Es de señalar que ha recibido las medallas: Conmemorativa 50 Aniversario del IPK, 60 Aniversario del IPK,

Centenario del Dr. Pedro Kourí, Medalla “Piti Fajardo” y la Distinción por la “Educación Cubana” medalla 20 Años en la Educación.

Es miembro de: Comisión Científica Pedagógica, Comisión de Grado Científico, Comisión Científica Especializada de Microbiología, Consejo Científico General del Instituto, Comisión de Otorgamiento de Categorías Científicas MINSAP, Presidenta de la Comisión Institucional para la Evaluación de Investigadores, Secretaria del Tribunal Permanente de Infectología y Medicina Tropical para la defensa de tesis de Doctorados, Comité Académico de la Maestría de Virología y Epidemiología, Miembro del Banco Nacional de Evaluadores (BNE), del Centro de Gerencia de Programas y Proyectos Priorizados (GEPROP) del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

## ANTECEDENTES

El dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral que es transmitida al hombre por la picadura de un mosquito infectado con cualquiera de los cuatro serotipos de los virus del complejo dengue, siendo *Aedes aegypti* su principal vector. Estos virus pertenecen a la familia *Flaviviridae* género flavivirus y se denominan: Dengue 1 (Den-1), Dengue 2 (Den-2), Dengue 3 (Den-3) y Dengue 4 (Den-4), (Henchal & Putnak, 1990).

Esta enfermedad de alcance global, puede causar un amplio rango de síntomas, desde una fiebre no diferenciada o un cuadro moderado conocido como fiebre del dengue (FD) hasta la forma más severa, conocida como fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) (Gubler, 1998a; Guzmán & Kourí, 2002).

El dengue es considerada en la actualidad una de las enfermedades de mayor importancia dentro de las enfermedades emergentes y re-emergentes transmitida por mosquitos, por su alta morbilidad, reportándose alrededor de 100 millones de personas infectadas anualmente, de las cuales aproximadamente 250 000 desarrollan la FHD y 10 000 mueren (Guzmán & Kourí, 2002). La diseminación de los 4 serotipos ha facilitado el incremento de casos de dengue hemorrágico (Gubler, 1998b; PAHO, 2000)

La mayoría de las descripciones clínicas de FHD son referidas en niños, considerando que desde su reconocimiento, durante la década de los 50, afectaba principalmente a niños menores de 16 años, incluyendo los menores de 1 año (Gubler, 1998a). A diferencia de lo que ocurre en el Sudeste de Asia, en la región de las Américas, la FHD ha afectado tanto a niños como adultos, observándose epidemias en las cuales han sido afectados sólo estos últimos (Guzmán & Kourí, 2002)

Cuba, aunque no es un país endémico de dengue, se ha visto afectada por diferentes epidemias. En 1977 el Den-1 produjo una gran epidemia la cual se extendió por todo el país (Mas, 1978). En 1981 un segundo serotipo correspondiente al Den-2 dio lugar a una epidemia de dengue hemorrágico (DH) (Kourí et al., 1983b). En el periodo de 1982 a 1996 no se reportó transmisión de dengue, hasta 1997 en que se reporta un brote de Den-2 en el municipio de Santiago de Cuba con casos de FHD en adultos (Kourí et al., 1998; Valdés et al., 1999). En septiembre de 2000 fue detectado un pequeño brote en Ciudad de la Habana, donde se aislaron los serotipos Den-3 y Den-4, siendo controlado en diciembre de ese mismo año. En junio de

2001 se presenta una nueva epidemia, confirmándose el Den-3 como el serotipo infectante, reportándose casos de FHD solamente en adultos (Peláez et al., 2004). Más tarde en el 2006 se produjo otra epidemia que afectó principalmente a la Ciudad de la Habana con la circulación de los serotipos 3 y 4.

En relación con la patogenia de la enfermedad asociada al virus dengue, se han planteado algunas hipótesis para explicar la FHD/SCD:

- La hipótesis planteada por Halstead (1970), expresa que la FHD/SCD ocurre en aquellas personas que ya tienen anticuerpos contra algún serotipo del virus dengue, los cuales, en presencia de un segundo serotipo infectante, permiten la formación de complejos inmunes (anticuerpos del primer serotipo más partículas virales del segundo serotipo) que provocan el desencadenamiento de una serie de procesos, en que participan activamente los monocitos y que concluyen con el aumento de la permeabilidad vascular y otras alteraciones que se observan en el dengue hemorrágico. La secuencia de infección de Den-1 seguida por Den-2 está asociada con la mayor mortalidad y morbilidad.
- La hipótesis planteada por Rosen (1977) expone que la virulencia de las distintas cepas de los cuatro serotipos del virus puede aumentar cuando estos agentes pasan repetidamente por el hospedero humano. De esta forma, las cepas más virulentas son las responsables de los síntomas graves que se observan en la FHD/SCD. La virulencia de ciertas variantes virales puede estar ligada a un determinismo genético (Rosen, 1986).
- La hipótesis integral planteada por Kourí y colaboradores (1987) incluye factores de riesgo individual relacionados con la existencia de anticuerpos contra el virus dengue, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma y la diabetes; factores de riesgo epidemiológicos relacionados con el vector (capacidad de ser infectante y alta densidad), el intervalo entre ambas infecciones, la amplia circulación viral y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. La presencia o ausencia de estos factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales hacen posible que ocurra o no una epidemia de FHD/SCD.
- Recientemente se han planteado otras hipótesis relacionadas con el agente viral, para explicar la patogenia de la FHD/SCD. Una de ellas se refiere a un cambio fenotípico rápido, la selección de mutantes de escape a la neutralización (Guzmán et al., 2000). Este fenómeno fue

observado en el virus de la poliomielitis tipo 3, después de la administración de la vacuna trivalente oral. En el caso del virus del dengue, un mecanismo parecido de selección de mutantes de escape a la neutralización podría ser la presencia de anticuerpos neutralizantes heterólogos después de la infección primaria, pues estos anticuerpos juegan un papel muy importante en el desarrollo de una infección secundaria.

- Por otra parte, Rothman (2003) plantea que durante una infección secundaria, se produce una activación masiva de las células T en su interacción con los monocitos infectados, lo que pudiera explicar el aumento de la permeabilidad vascular y los trastornos de la coagulación debido a la liberación de citoquinas y mediadores químicos por la activación de células T y los monocitos infectados. Este fenómeno podría explicar la presencia de choque y el sangramiento en el curso de la enfermedad.

Los virus del dengue son virus ARN de cadena positiva que contienen aproximadamente 11kb y codifica para un total de 10 proteínas, tres estructurales: Envoltura (E), Membrana (M) y Cápsida (C) y siete no estructurales (NS) (del inglés Non Structural): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (Chambers et al., 1990).

La proteína C es el primer polipéptido viral sintetizado. Es altamente básico, y esta característica se cree que influye en su interacción con el ARN (Heinz et al., 1995). El precursor glicosilado (prM) da lugar a la proteína M durante la etapa de maduración viral. La proteína M, localizada en la porción carbono terminal de la prM, se presenta en los viriones maduros. Anticuerpos contra prM pueden mediar la inmunidad protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contienen proteínas prM no procesadas (Osatomi & Sumiyoshi, 1990). La glicoproteína E constituye la proteína más grande del virión, y es el componente principal de las proyecciones de la superficie del mismo (Allison et al., 1995; Heinz et al., 1995).

La proteína NS1 es una glicoproteína conservada que parece ser esencial para la viabilidad del virus, pero no se ha establecido su actividad biológica (Dussart et al., 2006). Se asocia a la membrana y se secreta también al medio. Se ha encontrado, en altas concentraciones, en suero de pacientes infectados con dengue durante la fase temprana de la enfermedad (Alcon et al., 2002; Young et al., 2000). La proteína NS2 está constituida por 2 proteínas, la NS2a y la NS2b, la primera se ha identificado como una proteína hidrofóbica de 20 kDa de peso molecular, ésta

se localiza en los supuestos sitios de replicación del ARN y la segunda se requiere para el funcionamiento como cofactor en el complejo NS2b-NS3 con actividad proteasa (Bazan & Fletterick, 1989; Yamshchikov & Compans, 1994). La proteína NS3 se sugiere que sea una proteasa viral activa en el procesamiento post-traducciona l de la poliproteína, o un componente de la polimerasa viral de ARN o una proteína con ambas actividades enzimáticas (Murthy et al., 1999). La proteína NS4 se deriva de dos proteínas: NS4a y NS4b y se piensa que estas unidades sean cofactores del complejo enzimático de replicación del ARN (Osatomi & Sumiyoshi, 1990). La proteína NS5 se piensa que es la polimerasa viral de ARN dependiente de ARN (Osatomi & Sumiyoshi, 1990).

Cuando un individuo es picado por un mosquito infectado ocurre un período de incubación intrínseco desde 3 a 14 días de duración y como promedio de 4 a 7 días, donde se produce la multiplicación viral, después de este tiempo las personas pueden experimentar fiebre acompañada por una variedad de signos y síntomas. Durante esta fase aguda de la enfermedad, correspondiente a los primeros 5 días de comenzados los síntomas, el virus puede ser detectado en sangre (Gubler, 1998a; Guzmán & Kourí, 2004).

Los anticuerpos IgM anti-dengue que se producen en respuesta a la infección, se desarrollan rápidamente y se presentan en cantidades detectables a partir del quinto día de la enfermedad. En general, dichos anticuerpos IgM declinan hacia niveles no detectables entre los 30-90 días del comienzo de los síntomas. Se ha observado que en algunos individuos que sufren una infección secundaria por virus dengue, estos anticuerpos pueden estar ausentes o encontrarse en niveles bajos de concentración (Gubler, 1998a; Innis et al., 1989).

En los individuos que sufren su primoinfección, los anticuerpos IgG anti-dengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5to-6to día de comienzo de los síntomas y se hacen máximos hacia los 15-21 días alcanzando títulos de anticuerpos relativamente bajos. Posteriormente declinan permaneciendo detectables prácticamente durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi simultáneamente al comienzo de los síntomas, permaneciendo elevados durante varias semanas y declinando posteriormente. Estos altos niveles de anticuerpos IgG permiten un diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad (Kourí et al., 1983a; Monath & Heinz, 1996; PAHO, 1994)

Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la FHD, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país por la necesidad de diferenciar el dengue de otras enfermedades y como soporte a los sistemas de vigilancia de la enfermedad. El laboratorio puede brindar información temprana y precisa a las autoridades de salud, lo que favorece la toma inmediata y oportuna de las medidas adecuadas para el control.

El diagnóstico en el laboratorio puede enfrentarse a través del aislamiento e identificación viral por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, la demostración del antígeno viral por la inmunohistoquímica o inmunocitoquímica, la detección del ácido nucleico viral por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*), la demostración de anticuerpos IgM o de títulos elevados de anticuerpos IgG en monoseros o seroconversión o el incremento de 4 veces o más el título IgG en sueros pareados (Guzmán & Kourí, 2004; Kao et al., 2005; Shu & Huang, 2004; Teles et al., 2005)

A partir de la década de los 80 se comenzaron a desarrollar los sistemas inmuno enzimáticos conocidos como ELISA, los cuales han sido de gran utilidad en el diagnóstico serológico del virus dengue. El MAC-ELISA (del inglés *IgM antibodies capture enzyme linked immunosorbent assay*) aplicado para la detección de anticuerpos IgM a dengue, se ha convertido en una de las pruebas más utilizadas en los laboratorios, brindando un alto grado de sensibilidad y especificidad. Hasta el presente, este sistema es un invaluable método para la vigilancia de la FD y FHD/SCD, considerándose los anticuerpos IgM un importante marcador serológico de las infecciones por dengue (Shu et al., 2003; Takasaki et al., 2002).

También se han desarrollado sistemas ELISA para la detección de anticuerpos IgG lo que ha permitido sustituir la técnica clásica de la Inhibición de la hemaglutinación (IH) (Clark & Casals, 1958) haciendo más factible el diagnóstico (Kuno et al., 1991).

Hasta el momento, los estudios dirigidos a evaluar el comportamiento de la respuesta humoral inducida en el individuo infectado, están basados fundamentalmente en la producción de IgM e IgG y son pocos los reportes que existen en la literatura sobre otras inmunoglobulinas como la IgA e IgE (Balmaseda et al., 2003; Koraka et al., 2001) las cuales pudieran constituir marcadores importantes durante una infección por virus dengue.

Por otra parte, la principal fuente de anticuerpos evaluada en la mayoría de los estudios ha sido el suero. Una de las limitantes en los estudios serológicos, constituye la toma de este tipo de

muestra, sobre todo en aquellas personas donde la obtención de sangre venosa se hace difícil, como es el caso de los niños y ancianos, además de necesitar de personal calificado para su procesamiento. Es por ello, que es de gran importancia explorar la respuesta de anticuerpos en otros tipos de muestras como la saliva y la orina, las cuales son muestras no invasivas, fáciles de obtener, que no necesitan tratamiento adicional y pudieran ser indicadoras directas del comportamiento de las diferentes inmunoglobulinas en el suero.

Por otra parte, también se ha estado evaluando la reactividad cruzada y específica de los anticuerpos IgM frente a los diferentes serotipos virales para su utilización en el diagnóstico virológico (Nawa et al., 2000), sobre todo en aquellos países donde no existen condiciones para realizar el aislamiento viral o el PCR.

En la actualidad se considera de extrema necesidad el contar con una vacuna contra el dengue, debido a las características de la enfermedad y la ausencia de drogas antivirales efectivas contra la misma, el incremento paulatino en el número de enfermos, así como el incremento estimado no sólo en las epidemias y casos de FD y FHD, sino en el número de países afectados y finalmente, los problemas para el control y la eliminación de la enfermedad (Edelman, 2007; Guzmán et al., 2004; Hatch et al., 2008; Hombach, 2007; Stephenson, 2006).

El Comité de Expertos en Vacunas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó entre sus prioridades el dengue (Guzmán, 1998; WHO, 1999), por lo que diferentes grupos de investigadores se han incorporado al desarrollo de tal objetivo. Para esto es necesaria la obtención de un inmunógeno que brinde inmunidad protectora contra los cuatro serotipos del virus, tanto en niños como en adultos (Chang et al., 2004; Guzmán et al., 2004; Stephenson, 2005).

Varias estrategias para la obtención de una vacuna contra el dengue están actualmente en desarrollo, entre las que se encuentran: las vacunas atenuadas por vía convencional, vacunas quiméricas o vacunas vivas atenuadas recombinantes, vacunas recombinantes de subunidad y vacunas de ADN, algunas de ellas se hallan en estudios de fase I y otras en fase II (Bhamarapravati & Sutee, 2000; Butrapet et al., 2002; Guirakhoo et al., 2000; Huang et al., 2000; Huang et al., 2003).

A pesar que desde la década de los 60 del siglo pasado se viene trabajando en la obtención de una vacuna contra el dengue, aún no se encuentra ninguna disponible. Entre los principales

problemas para el desarrollo de una vacuna están: la existencia de cuatro serotipos, el fenómeno de la inmunoamplificación, la inexistencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la enfermedad (Chang et al., 2004; Guzmán et al., 2004; Stephenson, 2005).

La Iniciativa de la Vacuna de Dengue para la Infancia (PDVI, del inglés, Pediatric Dengue Vaccine Initiative) fue creada recientemente con el objetivo de poder disponer de fondos, que contribuyan al avance de las investigaciones lo que permitiría en un tiempo más corto lograr una vacuna segura para la infancia (Hombach, 2007).

No obstante a todos los estudios y resultados obtenidos hasta el momento, un inmunógeno contra el dengue no estará disponible hasta al menos 5 a 10 años, por lo que aún sigue siendo una prioridad para los países afectados, el control y la erradicación del vector, y el desarrollo de sistemas efectivos para la prevención y control de la enfermedad (WHO, 1999).

## **RESUMEN DE LAS PRINCIPALES INVESTIGACIONES REALIZADAS POR LA AUTORA SOBRE LA TEMÁTICA DEL DENGUE A PARTIR DE SU OBTENCIÓN DEL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS (1997-2008)**

En el presente documento se muestran de forma resumida, los principales trabajos de investigación realizados por la autora a partir de su obtención del grado científico de Doctor en Ciencias Médicas (1996), los cuales serán agrupados según el tema y no necesariamente en orden cronológico de realización, denominándose como:

1. Evaluación de sistemas diagnósticos para la detección de anticuerpos o antígenos a virus dengue.
2. Estudio de la respuesta inmune humoral en pacientes con infección a virus dengue.
3. Estudios básicos relacionados con la proteína prM del virus dengue.

### **1. Evaluación de sistemas diagnósticos para la detección de anticuerpos o antígenos a virus dengue**

El laboratorio de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, es el Laboratorio de Referencia para el estudio de las enfermedades transmitidas por artrópodos y forma parte del Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS) para el Estudio del Dengue y su Vector.

En este laboratorio se han desarrollado diferentes métodos para el diagnóstico serológico de esta enfermedad, entre los cuales podemos señalar: la detección de anticuerpos IgM por un ELISA de captura (MAC-ELISA) (Vázquez et al., 2003a; Vázquez et al., 2005; Vázquez et al., 1998b), y la detección de anticuerpos IgG mediante el Método de ELISA de Inhibición (MEI) (Fernández & Vázquez, 1990; Vázquez et al., 1997a; Vázquez et al., 1997b; Vázquez & Fernández, 1989), los cuales han sido evaluados, teniendo en cuenta los criterios establecidos por la OMS/OPS utilizando como técnica de referencia la Inhibición de la Hemaglutinación (IH) (Clark & Casals, 1958; PAHO, 1994; Vázquez et al., 1997b).

Estos sistemas han sido y son aplicado en la actualidad en:

- La vigilancia serológica del dengue en Cuba

- La detección y confirmación temprana de la transmisión, caracterización y seguimiento de las epidemias y la certificación del cese de la transmisión.
- Técnicas de referencia para la evaluación de diferentes sistemas diagnósticos tanto comerciales como no comerciales.
- Pruebas para el Control de la Calidad del diagnóstico serológico del dengue en los países de la región como parte de las actividades de centro colaborador OPS/OMS.
- Encuestas sero-epidemiológicas a virus dengue.
- Investigaciones relacionadas con: la respuesta inmune humoral en pacientes con infección por dengue, la patogenia de la enfermedad y la búsqueda de un inmunógeno como posible candidato vacunal contra el dengue.
- Serotipificación de anticuerpos IgM y su posible uso como método de diagnóstico virológico

Recientemente se han desarrollado otros sistemas ELISA que han permitido la detección de anticuerpos como la IgA e IgE. Estos sistemas también han sido aplicados en diferentes investigaciones tanto en Cuba como en otros países de la región, lo que ha permitido caracterizar otros marcadores de la respuesta inmune humoral en pacientes con un diagnóstico clínico de infección por dengue (Vázquez et al., 2007a; Vázquez et al., 2005).

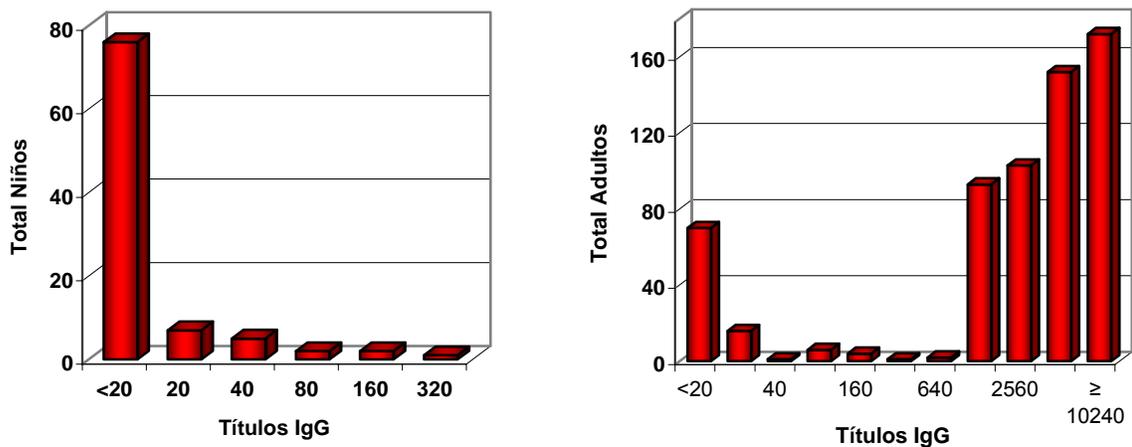
### **1.1. Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG en niños y adultos con infección a virus dengue mediante el MEI.**

Como se ha señalado anteriormente, el MEI ha sido aplicado ampliamente tanto en la vigilancia como en trabajos de investigación, para ello se han aplicado los criterios relacionados con la confirmación de un caso de dengue a partir de sueros pareados en los que se observa una seroconversión o incremento de título de anticuerpos, haciéndose posible además definir un caso primario o secundario.

La dificultad de obtener pares de sueros para la confirmación de casos ha hecho que se le de un gran valor a la muestra tomada a partir del quinto día de inicio de la fiebre, la cual se utiliza en la detección de anticuerpos IgM y que permite confirmar un caso en áreas no endémicas, así como definir una infección reciente. Esta importancia radica no sólo en la detección de

anticuerpos IgM, sino también en la detección de anticuerpos IgG con el objetivo de definir tanto la presencia de un caso reciente así como definir el tipo de infección (Cuzzubbo et al., 2000; Innis et al., 1989). Es por ello que nos propusimos estudiar la respuesta de anticuerpos IgG en muestras de suero tomadas entre los días 5 y 7 de comienzo de la fiebre, procedentes de casos con infección al virus dengue durante la epidemia del 2001-2002, que nos permitiera definir el tipo de infección basándonos en nuestras condiciones epidemiológicas.

En este estudio encontramos en los niños un patrón de respuesta donde el título predominante fue de < 20 seguido del de 20. En los adultos encontramos dos patrones de respuesta uno similar al de los niños y otros donde predominaban títulos altos de 1280 o mayores a este valor. Las condiciones epidemiológicas de nuestro país mostraban que los niños en la epidemia de Den-3, 2001-2002 deberían presentar una respuesta de tipo primaria mientras que en los adultos debería esperarse ambos tipos de respuesta (primaria y secundaria) (Figura 1.1).



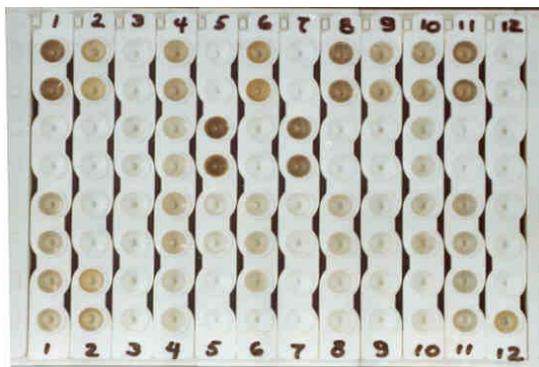
**Figura 1.1: Distribución de los títulos de anticuerpos en niños y adultos.**

Este estudio nos permitió establecer criterios para definir un caso primario y secundario teniendo en cuenta el título de anticuerpos en muestras tomadas entre el 5to y 7mo día de la enfermedad (Acosta, 2006; Vázquez et al., 2008).

## 1.2. AuBioDOT-IgM. Un sistema visual y rápido para el diagnóstico serológico del virus dengue

Debido a la necesidad de métodos serológicos rápidos y fáciles de ejecutar y que no requieran de equipamiento, nos propusimos desarrollar un sistema para la detección de anticuerpos IgM que pudiera ser de utilidad para realizar el diagnóstico en condiciones de campo, si fuese necesario. Para ello desarrollamos un método visual, que se denominó AuBioDOT el cual es un sistema basado en el mismo principio del MAC-ELISA diferenciándose en la utilización de un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal y su amplificación con reveladores de plata. Este sistema ha sido desarrollado para la operación manual y lectura visual de los resultados que son obtenidos en un menor tiempo de ejecución.

Se realizó un estudio comparando el AuBioDOT- IgM con el MAC-ELISA como sistema de referencia utilizando un panel de 336 sueros provenientes de pacientes con un diagnóstico clínico de dengue y de sueros de banco de sangre o de pacientes con infección no relacionada por virus dengue (hepatitis A, influenza y leptospirosis). Un total de 127 sueros fueron positivos por ambas pruebas para un 97.7 % de sensibilidad (IC 95 %, 92.89 - 99.40) y 170 negativos para una especificidad del 96.6 % (IC 95 %, 92.39 - 98.61). La concordancia fue del 97.1 % para un índice de Kappa de 0.94. En la figura 1.2 se muestra como se presenta el resultado en la lectura visual.



**Figura 1.2: Sistema AuBioDOT lectura visual.**  
(Color = positivo - No color = negativo)

El sistema AuBioDOT para la detección de anticuerpos IgM anti-dengue es un nuevo ensayo que ha mostrado altos valores de sensibilidad, especificidad y concordancia comparado con el MAC-ELISA. Es un sistema de fácil realización, con lectura visual de los resultados y rapidez

de ejecución, brindando el diagnóstico en 1 hora a partir del momento de recepción de la muestra. Este método no instrumental, es de gran utilidad en condiciones de campo y en aquellos laboratorios con poco equipamiento, por lo que es una alternativa para la vigilancia serológica de esta enfermedad (Vázquez et al., 2003a).

## **1.2. Aplicación del MAC-ELISA y el MEI para la detección de anticuerpos IgM e IgG al virus de la fiebre amarilla (FA)**

El virus de la FA es el virus prototipo del género flavivirus de la familia *Flaviviridae*, y es transmitido al hombre al igual que el dengue a través del mosquito *Aedes aegypti*. En los últimos años se ha observado un incremento de la FA selvática en el sur de las Américas y más recientemente una epidemia urbana en Paraguay. Este incremento puede estar relacionado al desarrollo económico, particularmente la construcción de carreteras y el crecimiento interno de los servicios aéreos entre otros, amplifican el riesgo de la difusión de la enfermedad (Monath, 1997).

A pesar de que existe una vacuna efectiva contra la FA, muchos países que están en riesgo, tienen poca cobertura de vacunación, lo que ha conllevado un incremento de la vigilancia seroepidemiológica de esta enfermedad.

En Cuba, aunque no circula la FA, las condiciones para su circulación pueden ser propicias por la presencia del vector transmisor, por lo que se hacía necesario contar con un sistema diagnóstico que pudiera ser aplicable para esta enfermedad. Para ello se modificaron los dos sistemas utilizados para dengue y se incluyeron en el estudio muestras de personas vacunadas contra la FA (vacuna 17D) y también muestras de pacientes con infección al virus dengue para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos. Se incluyó además la técnica de neutralización por reducción de placas como técnica de referencia (NTRP).

En las tablas 1.1 y 1.2 se comparan los resultados por las técnicas MAC-ELISA y MEI con los obtenidos por la neutralización.

**Tabla 1.1. Resultados obtenidos mediante NTRP y el MAC-ELISA/FA en sueros pareados de las personas vacunadas y el grupo control de negativos.**

		NTRP	
		+	-
MAC-ELISA/FA	+	16	0
	-	1	29

Sensibilidad: 94.1 %  
(IC 95 %: 69,2 - 99,7);  
Especificidad: 100 %  
(IC 95 %: 85,4 - 100,0);  
Índice Kappa: 95.3 %  
(IC 95 %: 86,1 - 100,0).

**Tabla 1.2. Resultados obtenidos mediante NTRP y el MEI/FA en sueros pareados de personas vacunadas y el grupo control de negativos.**

		NTRP	
		+	-
MEI/FA	+	14	0
	-	3	29

Sensibilidad: 82.4 %  
(IC 95%: 69.2 - 99.7);  
Especificidad: 100 %  
(IC 95 %: 85.4 - 100.0);  
Índice Kappa: 85.5 %  
(CI 95 %: 69.7 - 100.0).

La reactividad cruzada de anticuerpos IgM a dengue y a FA fue también evaluada, mostrando una alta especificidad de los anticuerpos IgM a FA cuando se enfrentaron a antígeno de dengue, sin embargo un 10.7 % de los casos IgM positivos a dengue mostraron reactividad cruzada contra antígeno de FA, aunque los valores de DO eran mucho mas bajos que los obtenidos cuando se enfrentaron a los de dengue.

Los resultados obtenidos muestran que ambos sistemas pueden ser de utilidad en el diagnóstico, la vigilancia y en la evaluación de la respuesta a la vacuna de FA (Vázquez et al., 2003b).

#### **1.4. Evaluación de sistemas comerciales para el diagnóstico serológico a virus dengue**

La búsqueda de métodos que permitan brindar un diagnóstico más rápido, ha conllevado al desarrollo de diferentes variantes para la detección de IgM anti-dengue, los que en su mayoría

se basan en el principio de captura de anticuerpos IgM mediante los ensayos tipo ELISA (Branch & Levett, 1999; Cuzzubbo et al., 2001; Groen et al., 2000; Vaughn et al., 1999; Vázquez et al., 2003a).

A pesar de que existen diferentes estuches comerciales para el diagnóstico serológico del dengue, ninguno ha sido aprobado, hasta el momento, por la OMS, para ser utilizado en la vigilancia, en el diagnóstico o en estudios de investigación relacionados con vacuna. Algunos de estos estuches están siendo evaluados por una iniciativa del TDR/PDVI/OMS.

#### **1.4.1. Evaluación del sistema diagnóstico UMELISA DENGUE IgM PLUS**

El UltraMicroELISA (UMELISA) Dengue IgM Plus es una nueva versión del UMELISA Dengue IgM, desarrollado anteriormente por el Centro de Inmunoensayo (CIE) (Herrera et al., 2005; Laferte et al., 1992) el cual había sido empleado en la vigilancia serológica en nuestro país así como en otros países de la región entre ellos Colombia y Venezuela, como apoyo a la vigilancia clínico-epidemiológica para la prevención y control del dengue.

En este trabajo se evaluó esta nueva versión, que combina las ventajas de una reacción de elevada afinidad entre la estreptavidina y la biotina, utilizando como referencia el sistema ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) a dengue (Vázquez et al., 1998b) desarrollado en el Laboratorio de Arbovirus del IPK. Los resultados obtenidos al comparar las 451 muestras de sueros trabajadas por ambos métodos son presentados en la tabla 1.3. Se observó una elevada sensibilidad (99,37 %), especificidad (94,82 %) y concordancia (96,4 %) entre ambos sistemas, con un Índice de Kappa de 0,924 para un intervalo de confianza del 95 %.

**Tabla 1.3: Resultados del estudio comparativo entre el UMELISA Dengue IgM PLUS y el MAC-ELISA en 451 muestras de sueros estudiados**

		MAC-ELISA	
		+	-
UMELISA	+	<b>160</b>	<b>15</b>
	-	<b>1</b>	<b>275</b>

La precisión del ensayo mostró valores del coeficiente de variación (CV) adecuados, siendo < 10 % para la repetibilidad y < 20 % para la reproducibilidad.

El estuche UMELISA Dengue IgM PLUS para la detección de anticuerpos IgM al virus dengue en suero humano es un sistema rápido (menos de 3 horas), emplea volúmenes pequeños de reactivos y de muestras y su diseño permite procesar un gran número de sueros.

Los resultados de esta evaluación mostraron una elevada de sensibilidad y especificidad, sugiriendo su utilidad en el diagnóstico, la vigilancia seroepidemiológica de dengue, así como su uso como sistema de pesquisa en los laboratorios de la región.

Este estuche es utilizado actualmente en todas las provincias del país a través de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) lo que ha permitido que la vigilancia seroepidemiológica de esta enfermedad en nuestro país sea más rápida y efectiva (Vázquez et al., 2007c).

#### **1.4.2. Evaluación de dos sistemas comerciales tipo ELISA de captura IgM e IgG (Panbio) para el diagnóstico serológico del dengue**

El objetivo del estudio fue evaluar dos sistemas comerciales de la firma Panbio (Brisbane, Australia), diseñados para la detección de anticuerpos IgM e IgG a virus dengue.

En este trabajo fueron incluidas un total de 373 muestras de suero que pertenecían a casos primarios, secundarios, infecciones no relacionadas con dengue e individuos sanos. Los dos sistemas ELISA desarrollados en el IPK (MAC-ELISA y MEI) fueron aplicados como técnicas de referencia.

Los valores de sensibilidad, especificidad y concordancia fueron encontrados altos. El 94.2 % de los casos fueron clasificados como primarios o secundarios por el sistema IgG Panbio (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4: Comparación del sistema Panbio Dengue IgM/IgG con MAC-ELISA/MEI en relación al tipo de infección primaria o secundaria**

		MAC-ELISA y MEI/ Dengue IPK			
P A N B I O		P	S	N	Total Panbio
		P	56	3	1
	S	0	91	0	91
	N	4	0	218	222
<b>Total IPK</b>		<b>60</b>	<b>94</b>	<b>219</b>	<b>373</b>

P (infección primaria)

S (infección secundaria)

N (negativos o infección pasada a dengue)

Los resultados de este estudio permitieron concluir que los sistemas de ELISA-IgM e IgG Panbio pueden ser una alternativa para el diagnóstico del dengue, son fáciles de realizar y los resultados pueden ser obtenidos en 3 horas (Vázquez et al., 2007b).

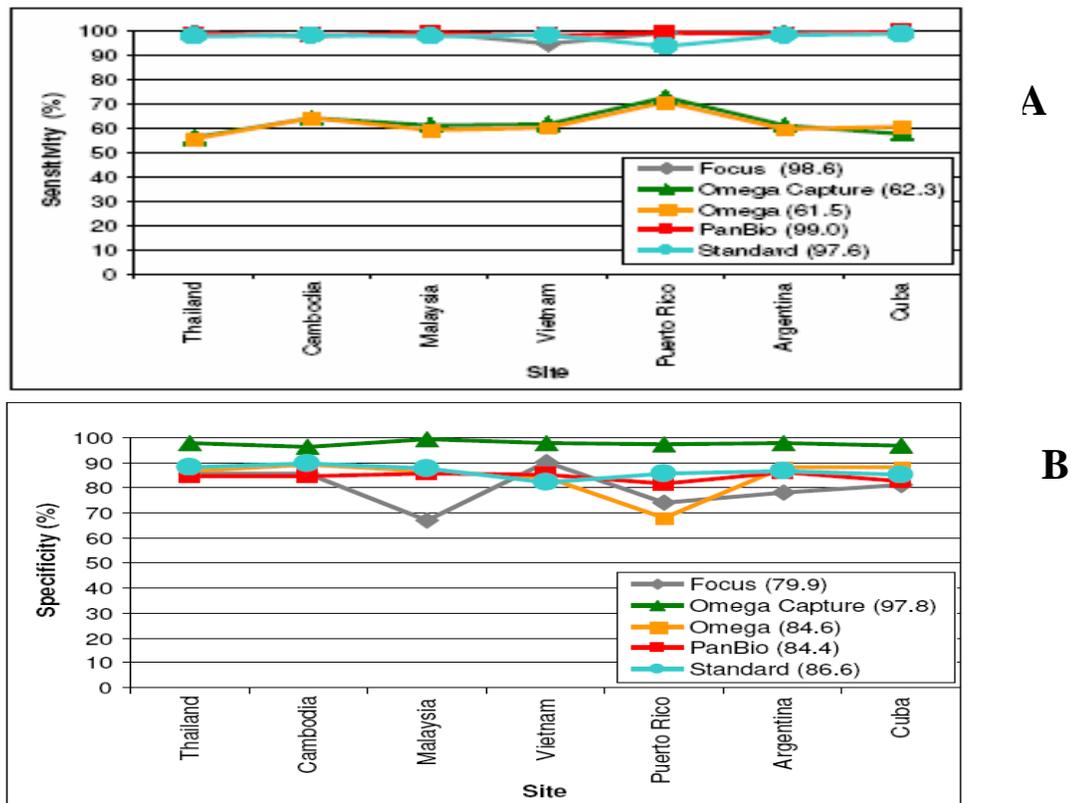
#### **1.4.3. Evaluación de 9 sistemas comerciales (5 ELISA y 4 pruebas rápidas) como una iniciativa del TDR/PDVI/OMS**

El Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales, TDR organizó un proyecto financiado por el TDR/OMS y la Iniciativa para la Vacuna de Dengue para la Infancia (PDVI), con el objetivo de evaluar diferentes sistemas comerciales disponibles para el diagnóstico serológico del dengue. Para este proyecto fueron seleccionados 7 laboratorios de dos regiones geográficas, en el Sudeste asiático (Universidad de Mahidol, Bangkok Tailandia; Instituto Pasteur, Phnom Penh, Camboya, Hospital para Enfermedades Tropicales Ciudad Ho Chi Minh, Vietnam y la Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia) y en las Américas (CDC, San Juan, Puerto Rico; Instituto Nacional Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" Pergamino, Argentina y el Instituto Medicina Tropical "Pedro Kourí," IPK, Havana, Cuba). Para esta selección se tuvieron en cuenta diferentes parámetros entre los que se encontraban: la capacidad y habilidad para realizar las pruebas estándar para el diagnóstico del dengue, incluyendo las determinaciones de anticuerpos IgM e IgG; la experiencia del investigador principal y del laboratorio con un enfoque al diagnóstico.

Un total de 9 estuches comerciales fueron evaluados, los cuales incluyen formatos ELISA, tiras reactivas y western blot (WB), estos dos últimos corresponden a las pruebas rápidas (PR). Los estuches comerciales fueron los siguientes:

- Panbio (Australia) (ELISA captura IgM y PR captura IgM e IgG)
- Focus Diagnostics (EU) (ELISA captura IgM)
- Standard Diagnostic (Sur-Corea) (ELISA captura IgM y PR captura IgM e IgG)
- Omega Diagnostics Ltd (UK) (ELISA indirecto y captura IgM)
- Pentax (PR aglutinación IgM)
- Tulip group (India) (PR captura IgM e IgG).

Un total de 350 muestras de sueros fueron incluidas en el estudio, las cuales estaban conformadas por muestras positivas de casos primarios y secundarios a dengue, muestras negativas de pacientes con otras patologías y de individuos sanos donantes de sangre. En las figuras 1.3 (A y B) se muestran la sensibilidad y la especificidad obtenidas para los 5 estuches diagnósticos ELISA y para cada laboratorio.



**Figura 1.3. Resultados de la sensibilidad (A) y de la especificidad (B) obtenida en cada uno de los sistemas ELISA estudiados en cada laboratorio.**

Los resultados mostraron que los sistemas ELISA: Panbio, Standard y Focus, fueron los que resultaron aceptables por su sensibilidad, especificidad y precisión (reproducibilidad). Ninguna de las pruebas rápidas brindó resultados satisfactorios.

Este trabajo permitió proveer una evaluación de calidad de pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos IgM a virus dengue e informar a los productores como mejorar estos sistemas. Además, se cumplió el objetivo principal de este estudio permitiendo conocer cuales de los estuches evaluados eran útiles o no para la vigilancia, manejo del paciente y control de la enfermedad (Hunsperger et al., 2008).

### **1.5. Estudio de la proteína viral NS1 en pacientes con infección a virus dengue**

La infección por virus dengue es detectada por el uso de diferentes pruebas biológicas: aislamiento viral en células de mosquitos (Henchal et al., 1983); detección del ARN viral mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés polimerase chain reaction) (Lanciotti et al., 1992; Rosario et al., 1998); o pruebas serológicas, como los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida conocidos como ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) (Kuno et al., 1991; Vázquez et al., 1998b).

La técnica del PCR es costosa y se hace engorrosa su implementación para muchos laboratorios. El MAC-ELISA es una técnica fiable pero sólo puede brindar un diagnóstico de la enfermedad transcurridos cinco días después del comienzo de los síntomas, ya que es cuando los anticuerpos específicos se hacen detectables en el suero de los pacientes infectados con el virus dengue (WHO, 1997).

Las dificultades actuales que se presentan en el diagnóstico virológico y serológico del dengue ha hecho necesario la búsqueda de métodos que sean económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y sobre todo que permitan dar un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Recientemente, se ha valorado la posibilidad de detectar mediante métodos ELISA la proteína NS1 como un posible marcador de infección temprana, así mismo se han relacionado los niveles de esta proteína en suero con la etiopatogenia de la enfermedad (Alcon et al., 2002; Young et al., 2000). En la actualidad se han desarrollado dos sistemas enzimáticos para la detección de la proteína NS1 de las firmas comerciales Panbio (Australia) y Bio-Rad (Francia), los cuales se

encuentran en evaluación. Es por ello que nos propusimos evaluar la utilidad de la proteína NS1 como posible marcador temprano de infección por virus dengue utilizando el estuche comercial de la firma Bio-Rad denominado Platelia Dengue NS1 Antigen (Platelia NS1). Este sistema emplea un ELISA de doble anticuerpos (Ac), conformado por anticuerpos monoclonales (AcM) anti-NS1 para su captura y revelado.

En el estudio se trabajaron 210 muestras de sueros procedentes de 71 pacientes que fueron ingresados en el Hospital Salvador Allende durante los meses de septiembre y octubre de 2006 con un diagnóstico clínico de infección por dengue. Todos estos pacientes fueron confirmados como casos de dengue por ser positivos de anticuerpos IgM, estableciéndose esta prueba como criterio de inclusión para el estudio. Se realizó un muestreo cinético en cada paciente entre los días 2 y 7 de comienzo de los síntomas. Se incluyeron además 150 sueros de casos no-dengue como controles.

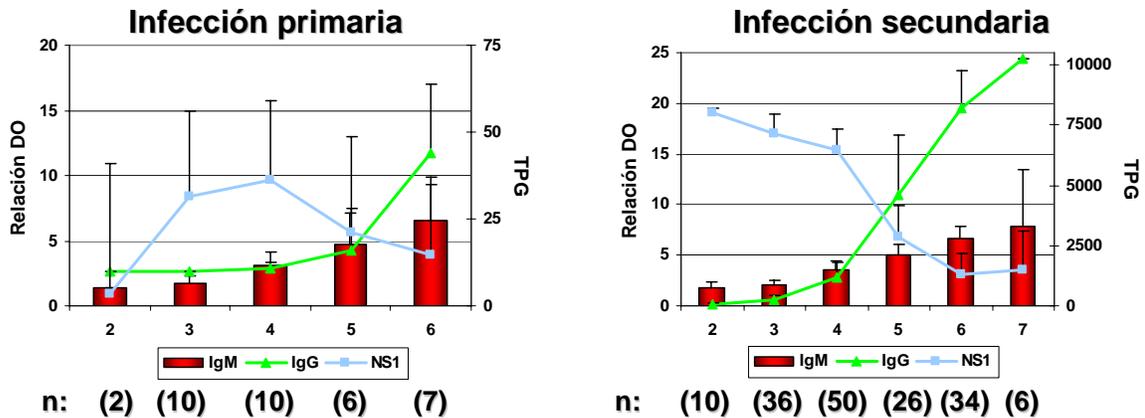
Los resultados obtenidos al comparar el sistema Platelia con el MAC-ELISA son presentados en a tabla 1.5.

**Tabla 1.5. Estudio comparativo entre Platelia NS1 y MAC-ELISA en los 221 pacientes estudiados**

<b>P L A T E L I A</b>		<b>MAC-ELISA</b>	
		<b>+</b>	<b>-</b>
<b>+</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	
<b>-</b>	<b>7</b>	<b>150</b>	

Los resultados obtenidos mostraron una sensibilidad 90.1 % (IC 95 %: 82.7 - 97.8); una especificidad de 100 % (IC 95 %: 99.7 - 100); el índice de validez 96.8 % (IC 95 %: 94.3 -99.4). Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) fueron 100 % (IC 95 %: 99.2 - 100) y 95.5 % (IC 95 %: 92.0 - 99.1).

De los 71 pacientes 12 fueron clasificados como primarios, 55 como secundarios y 4 como indeterminados. En la figura 1.4. (A y B) se presenta la cinética de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en los casos primarios y secundarios.



**Figura 1.4. : Cinética de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en sueros de pacientes con infección primaria (A) y secundaria (B).**

Los resultados obtenidos en la cinética de la proteína NS1 permiten concluir que los mejores días para la detección de esta proteína se encuentran entre el segundo y cuarto día de inicio de los síntomas, donde se lograron los mayores valores de DO, así como los mayores porcentajes de positividad, principalmente en casos secundarios (Barrero, 2007).

La detección de la proteína NS1 y la IgM de forma complementaria, permitirá lograr un avance en el diagnóstico de esta enfermedad en todos aquellos laboratorios que lleven a cabo un sistema de vigilancia, garantizando un mejor manejo del paciente así como un control temprano de la enfermedad.

En la actualidad, pocos son los trabajos dirigidos a valorar la utilidad de la proteína NS1 como marcador de infección reciente, así como su posibilidad de ser también un marcador de severidad, por lo que sería importante realizar estudios prospectivos que permitan confirmar el valor clínico de este ensayo. En estos momentos se está llevando a cabo un proyecto internacional relacionado al dengue y su control (DENCO), donde participan varios países de la región, entre ellos Cuba, teniendo entre sus objetivos principales la evaluación y utilidad de la proteína NS1. También sería de gran utilidad desarrollar pruebas diagnósticas comerciales para la detección de la proteína NS1 serotipo específica, lo cual permitiría además de realizar un diagnóstico temprano, conocer el serotipo circulante.

### **Consideraciones:**

Los estudios relacionados al desarrollo y evaluación de sistemas diagnósticos nos permiten hacer las siguientes consideraciones:

- 1) El Laboratorio Nacional de Referencia del Dengue del IPK cuenta con dos sistemas de tipo ELISA para el diagnóstico serológico de esta enfermedad, que además han sido utilizados como métodos de referencia.
- 2) El MEI permite clasificar un caso en primario o secundario a partir de un suero tomado entre el 5to y 7mo día de comenzada la fiebre y con IgM positiva.
- 3) Se desarrolló y evaluó un sistema visual y rápido, denominado AuBioDOT-IgM, que puede ser de utilidad para el diagnóstico serológico del virus dengue sobre todo en aquellos laboratorios que disponen de poco equipamiento o se requiera trabajar en condiciones de campo.
- 4) Los dos sistemas ELISA aplicados en la vigilancia del dengue, sirvieron de base para la preparación de dos sistemas modificados para el diagnóstico serológico de la FA, lo que permite introducir nuevos métodos útiles tanto para la vigilancia de esta enfermedad como para ser aplicado en el estudio de personas vacunadas.
- 5) Los resultados obtenidos en la evaluación realizada al sistema “UMELISA IgM plus” (sistema comercial CIE) permitió su aplicación en el diagnóstico y la vigilancia seroepidemiológica del dengue, contribuyendo por tanto al procesamiento de la muestra de forma más rápida, a un diagnóstico más temprano y por tanto a un mejor control de la enfermedad.
- 6) La evaluación de pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos IgM a virus dengue permite conocer qué tipos de estuches son útiles o no, para la vigilancia, manejo del paciente y control de la enfermedad.
- 7) La detección de la proteína NS1 y la IgM de forma complementaria, permitirá lograr un avance en el diagnóstico de esta enfermedad en todos aquellos laboratorios que lleven a cabo un sistema de vigilancia del virus dengue, garantizando también un mejor manejo del paciente y un control temprano de la enfermedad.

## **2. Estudio de la respuesta inmune humoral en pacientes con infección a virus dengue**

La infección por virus dengue induce una respuesta de anticuerpos que juega un papel fundamental en la protección; sin embargo, también están involucrados en la patogenia de la enfermedad. Hasta el presente, la inmunoglobulina M es un importante marcador serológico de las infecciones por dengue. La importancia y utilidad de otros marcadores serológicos como la IgA y la IgE en el diagnóstico, así como su papel en la protección o recuperación de la infección o en la severidad de la enfermedad ha sido poco estudiada. Por otra parte la especificidad de la IgM a los diferentes serotipos y su utilidad para un diagnóstico virológico también ha sido poco evaluada.

### **2.1. Estudio de la respuesta de diferentes marcadores serológicos en pacientes con infección primaria y secundaria durante la epidemia de Den-3 (2001-2002)**

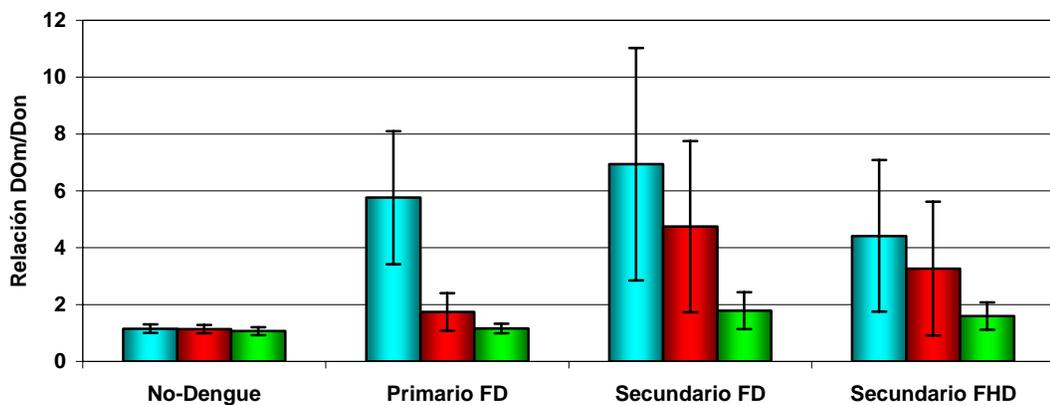
Entre el 2001 y el 2002 ocurrió una epidemia causada por el serotipo 3, principalmente en la Ciudad de la Habana, con un total de 12 889 casos confirmados, 81 de FHD/SCD y 3 fallecidos (Peláez et al., 2004). Los casos graves y fallecidos fueron observados en adultos, lo que sugería, a diferencia de los niños, que estos pacientes podían estar cursando por una infección secundaria (Kourí et al., 1998)

#### **2.1.1. Respuesta a IgM, IgA e IgE a virus dengue en pacientes adultos con infección primaria y secundaria y con un cuadro clínico de FD o FHD**

Durante la epidemia 2001-2002 se realizó un estudio serológico, con el objetivo de conocer la respuesta inmune humoral en pacientes con infección por dengue, teniendo en cuenta diferentes marcadores como las inmunoglobulinas específicas a dengue: IgM, IgG, IgA e IgE. Se tomaron un total de 127 muestras de suero procedentes de pacientes con 5 a 7 días de iniciado los síntomas. Sobre la base de los resultados obtenidos por las técnicas de detección de anticuerpos IgM e IgG los pacientes fueron considerados como casos de infección reciente (positivos a IgM) y clasificados 42 como infección primaria y 85 como infección secundaria en dependencia de la respuesta de anticuerpos IgG. También el grupo de estudio fue clasificado según su cuadro clínico: como FD (42 primarios y 48 secundarios) o FHD (37 secundarios), según criterios establecidos en las Guías OPS (PAHO, 1994).

En la figura 2.1 se presentan los resultados obtenidos a IgM, IgA e IgE en las muestras de suero de cada grupo de estudio. Los valores de IgM fueron más altos en los casos de FD tanto

primarios como secundarios que en los casos de FHD, no se observaron diferencias significativas entre los casos de FD ( $p > 0.05$ ) pero sí cuando se compararon estos con los casos de FHD. La respuesta de anticuerpos IgA (figura 1) fue mayor en los casos secundarios que en los primarios, mostrando diferencias significativas entre todos los grupos ( $p < 0.05$ ), ocurriendo la mayor respuesta en los casos secundarios FD. Los niveles de IgE (figura 1) encontrados en los grupos secundarios fueron más altos que en el primario, independientemente del cuadro clínico, con diferencias significativas cuando se compararon entre ellos ( $p < 0.05$ ). La comparación entre los dos grupos de pacientes con infección secundaria no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ).



**Figura 2.1. Respuesta de anticuerpos IgM (■), IgA (■) e IgE (■) en casos primarios y secundarios y con FD y FHD.**

En diferentes estudios realizados se ha observado la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue en pacientes con infección primaria y secundaria y probablemente en pacientes con infección terciaria; sin embargo, se señala que esta respuesta en muchos casos secundarios y quizás en la mayoría de los casos terciarios permanece a niveles muy bajos o no detectables (Gubler, 1998a).

Diferentes autores han señalado una menor respuesta de anticuerpos IgM en individuos con infección secundaria al compararlos con la respuesta obtenida en individuos con infección primaria (Gubler, 1996; Innis et al., 1989). Se ha planteado que la baja respuesta o ausencia de anticuerpos IgM en casos secundarios puede ser debido al número limitado de nuevos epítopes presentados por el virus infectante (Innis et al., 1989).

En nuestro estudio podemos señalar, que a diferencia de lo que se plantea por otros autores, la respuesta de anticuerpos IgM fue similar en los casos FD tanto primario como secundario, a diferencia con los secundarios que mostraron un cuadro de FHD, por lo que la respuesta de anticuerpos IgM en muestras tomadas entre los días 5 y 7 de comienzo de los síntomas pudiera estar mas relacionada al cuadro clínico que al tipo de infección (Vázquez et al., 2005).

Con relación a la detección de anticuerpos IgA para el diagnóstico serológico podemos señalar que pudiera ser de utilidad como complemento de la IgM, teniendo en cuenta su corta duración (Talarmin et al., 1998), lo que permitiría confirmar una infección reciente, pero no en sustitución de la IgM, ya que tendríamos un mayor número de falsos negativos, principalmente en aquellos individuos con infección primaria.

Por otra parte, los altos niveles de anticuerpos IgE encontrados solamente en casos secundarios pudieran deberse a una relación entre la infección secundaria y el desarrollo de una respuesta Th2. Estudios realizados durante la epidemia de 1981 (Bravo et al., 1987; Kourí et al., 1987), mostraron que enfermedades como el asma, la diabetes y la sicklemia pueden ser considerados factores de riesgo individual para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. Individuos que sufren asma bronquial tienen una predisposición a una respuesta tipo Th2 y puede ser favorecido el cambio al isotipo IgE (Pérez et al., 2004).

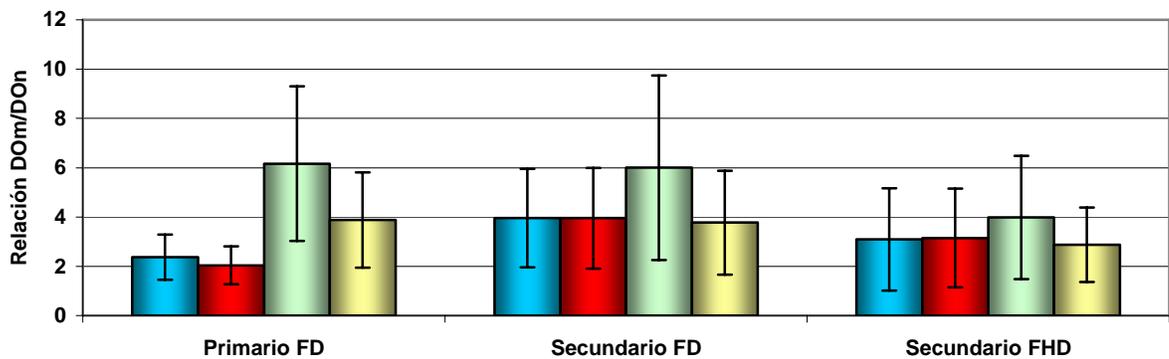
Los resultados de este estudio mostraron que los niveles de anticuerpos IgM, IgA e IgE en los pacientes con infección secundaria y FHD fueron más bajos que en los secundarios con FD. Estos resultados pudieran estar relacionados por la presencia de una mayor carga viral observada en los individuos que sufren la forma severa de la enfermedad, lo que probablemente conlleva a un mayor consumo de anticuerpos por formación de inmunocomplejos (IC) (Bhakdi & Kazatchkine, 1990; Libraty et al., 2002; Vaughn et al., 2000).

En este estudio se pudo evidenciar como factor de riesgo del cuadro grave de la enfermedad la presencia de una infección secundaria (Halstead, 1970), al encontrar que el 43.4% (37/85) de los casos secundarios fueron clasificados como FHD. Ninguno de los casos primarios mostró un cuadro de FHD.

### 2.1.2. Reactividad cruzada de los anticuerpos IgM frente a los cuatro serotipos

Como se ha señalado anteriormente, la identificación de los serotipos virales del dengue se realiza mediante métodos virológicos, entre los que se encuentran el uso de la técnica de IFI con la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos a los diferentes serotipos y también la prueba del PCR. En ausencia de un diagnóstico virológico, el MAC-ELISA pudiera representar una alternativa interesante para la identificación de los serotipos del virus dengue.

En este estudio la técnica MAC-ELISA fue aplicada para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos IgM frente a los cuatro serotipos de dengue en muestras de suero de pacientes de la epidemia 2001-2002. En todos los grupos se observó una mayor respuesta al serotipo 3 (figura 2.2) (Vázquez et al., 2005), el cual era el agente etiológico que circuló en esa epidemia (Peláez et al., 2004)



**Figura 2.2: Reactividad cruzada de la IgM frente a los cuatro serotipos del virus dengue en sueros de pacientes de la epidemia Den-3, 2001-2002**

(Den-1 ■, Den-2 ■, Den-3 ■, Den-4 ■)

Otros estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando muestras de suero procedentes de Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Cuba permitieron también la identificación del serotipo asociado a las epidemias ocurridas en estos países, excepto en Nicaragua que no pudo definirse por estar circulando a la misma vez más de un serotipo (Delgado et al., 2002).

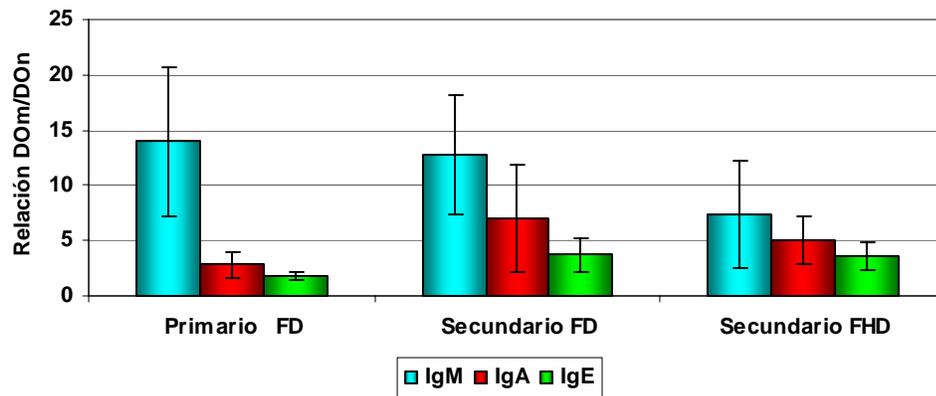
El MAC-ELISA pudiera ser una alternativa para conocer el serotipo infectante en aquellos laboratorios que realizan una vigilancia seroepidemiológica al virus dengue (Vázquez et al., 2005).

## 2.2. Estudio de la respuesta de diferentes marcadores serológicos en niños con infección primaria y secundaria durante la epidemia de Den-4 ocurrida en El Salvador en el 2002

Con el objetivo de valorar el comportamiento de la respuesta inmune humoral en niños, se realizó un estudio en 71 muestras de suero de pacientes salvadoreños menores de 15 años de los cuales 34 presentaban un cuadro de FD y 37 de FHD. Trece de los casos con FD fueron clasificados como infección primaria y 21 como infección secundaria. Todos los casos con FHD fueron secundarios. Estos pacientes procedían de la epidemia de Den-4 ocurrida en El Salvador en el 2002.

### 2.2.1. Respuesta a IgM, IgA e IgE a virus dengue en niños salvadoreños con infección primaria y secundaria y con un cuadro clínico de FD o FHD.

En la figura 2.3. se observa la respuesta de anticuerpos IgM, IgA e IgE en cada grupo de estudio.



**Figura 2.3. Respuesta de anticuerpos IgM, IgA e IgE en casos primarios y secundarios con FD y FHD en niños salvadoreños.**

Los niveles de anticuerpos IgM encontrados en casos primarios y secundarios de FD fueron similares, no así en los casos secundarios de FHD, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado en adultos cubanos (Vázquez et al, 2005).

En relación a la respuesta de anticuerpos IgA se observó también un comportamiento similar al estudio en adultos cubanos donde los niveles séricos de IgA fueron estadísticamente

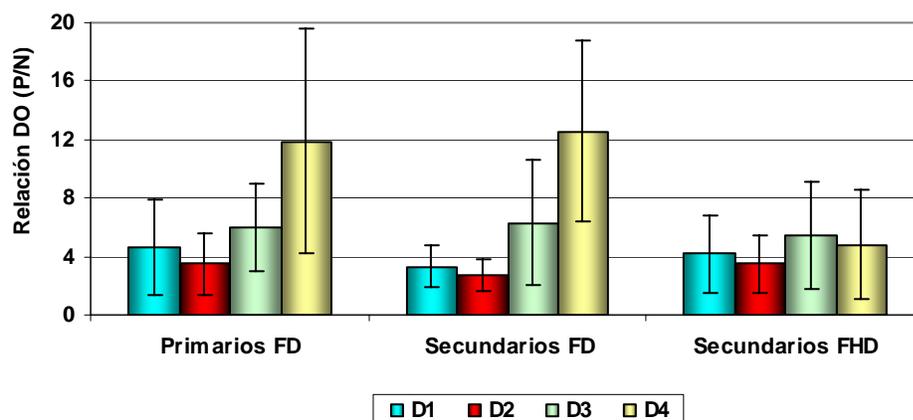
significativos entre los diferentes grupos de estudio y se observaron mayores valores en el grupo de secundarios FD (figura 2.3) (Castellanos, 2005).

Cuando se compararon los resultados obtenidos para los anticuerpos IgE entre primarios y secundarios FD o secundarios FHD fueron observadas diferencias significativas para una  $p < 0.0001$ . La comparación entre los dos grupos de casos secundarios no mostró diferencia significativa  $p > 0.05$ . Similares resultados fueron encontrados en el estudio de adultos cubanos (Vázquez et al, 2005).

En este estudio también se evidenció el papel de la infección secundaria como factor de riesgo del cuadro grave de la enfermedad (Halstead, 1970), al encontrar que el 63.8% (37/58) de los casos secundarios fueron clasificados como FHD.

### 2.2.2. Reactividad cruzada de los anticuerpos IgM frente a los cuatro serotipos

En este estudio también se aplicó la técnica MAC-ELISA para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos IgM frente a los cuatro serotipos en muestras de suero de pacientes de la epidemia de El Salvador. En los grupos de casos primarios y secundarios de FD se observó una mayor respuesta al serotipo 4 (figura 2.4), agente etiológico que circuló durante esa epidemia. Sin embargo en el grupo de FHD la respuesta fue muy homogénea y no pudo ser definido el serotipo circulante. A pesar de estos resultados con los casos de FHD consideramos que el uso del MAC-ELISA puede ser de utilidad para conocer el serotipo viral causante de la epidemia (Castellanos, 2005).



**Figura 2.4: Reactividad cruzada de la IgM frente a los cuatro serotipos del virus dengue en sueros de pacientes de la epidemia Den-3, 2001-2002**

Ambos estudios (Epidemia cubana y salvadoreña) son considerados los primeros reportes que correlacionan tres marcadores serológicos con la infección primaria y secundaria a dengue y con diferente cuadro clínico de la enfermedad en niños y en adultos.

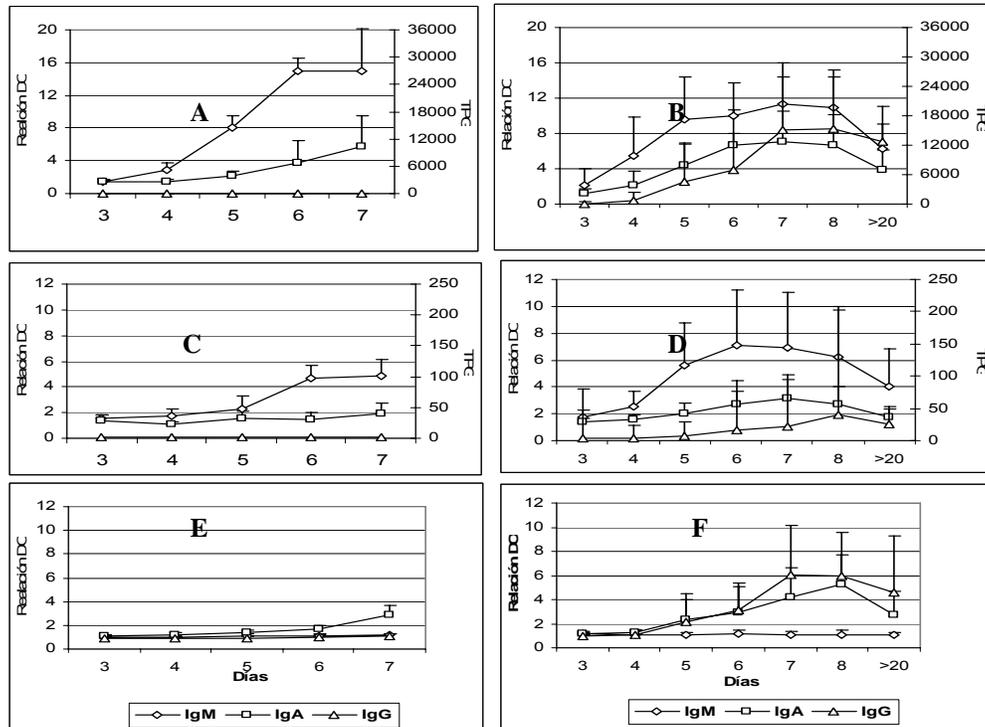
Es de señalar que a pesar de que se trabajaron muestras de sueros de diferentes pacientes desde el punto de vista étnico (cubanos y salvadoreños), etario (niños y adultos) y donde circularon diferentes serotipos virales (Den-3 y Den-4), los resultados mostraron comportamientos muy similares en la respuesta de anticuerpos IgM, IgA e IgE en muestras de suero tomadas entre los 5 a 7 días de comienzo de los síntomas, relacionados con el cuadro clínico y el tipo de infección primaria o secundaria.

### **2.3. Cinética de anticuerpos en muestras de suero, saliva y orina de pacientes adultos con infección primaria o secundaria a virus dengue**

En este trabajo nos propusimos estudiar la cinética de diferentes marcadores serológicos como la IgM, IgA e IgG en muestras de suero procedentes de pacientes con infección primaria y secundaria al virus dengue y comparar su comportamiento en otros tipos de muestras como la saliva y la orina. Por otra parte también se estudió la cinética de la respuesta de anticuerpos IgE totales y específicos pero en este caso, sólo en las muestras de suero.

#### **2.3.1. Cinética de anticuerpos IgM, IgA e IgG en suero, saliva y orina de pacientes con infección primaria o secundaria a virus dengue**

Un total de 411 muestras de suero, saliva y orina fueron obtenidas de 22 pacientes adultos hospitalizados en el IPK durante la epidemia de Den-3 (2001-2002) ocurrida en Ciudad de la Habana. Todos los pacientes fueron confirmados como casos de infección por dengue mediante el aislamiento viral y/o PCR. En la figura 2.5 se presenta la cinética de los anticuerpos IgM, IgA e IgG en las muestras de suero, saliva y orina en los casos primarios y secundarios.



**Figura 2.5: Cinética de anticuerpos IgM, IgA e IgG a virus dengue en muestras de sueros (A casos primarios, B casos secundarios), en saliva (C casos primarios, D casos secundarios) y en orina (E casos primarios, F casos secundarios). Eje principal Y media aritmética + desviación estándar (DE) de la relación de las densidades ópticas (DO) para IgM e IgA por MAC-ELISA y AAC ELISA. Eje secundario Y título promedio geométrico (TPG) de los anticuerpos IgG por MEI en suero y saliva (A, B, C y D). IgG en orina media de la relación DO + DE por GAC-ELISA (E y F eje principal Y).**

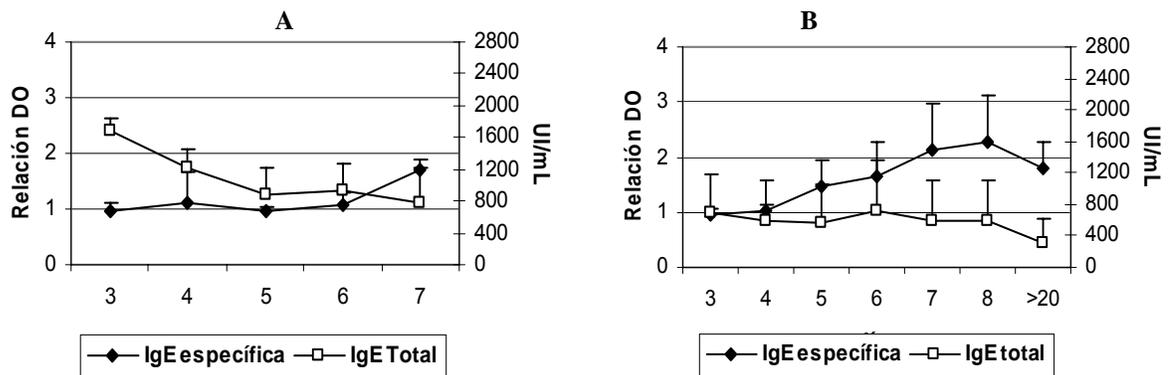
La cinética de los anticuerpos IgM, IgA o IgG en las muestras de suero y saliva mostraron un patrón similar, tanto en los casos primarios como en los secundarios, pero a pesar de este patrón similar los valores en saliva fueron 20 veces menores. En orina no se detectaron anticuerpos IgM; sin embargo, los anticuerpos IgA si fueron detectables tanto en primarios como en secundarios, mostrando un patrón similar como en el suero y la saliva. También fueron detectados anticuerpos IgG en la orina, pero sólo en los casos secundarios.

En este estudio se confirma que los anticuerpos IgM específicos son el marcador de preferencia para el diagnóstico serológico temprano del dengue. Los resultados obtenidos muestran que la IgM en saliva pudiera ser también útil para el diagnóstico serológico. La IgA anti-dengue detectada en las muestras estudiadas nos indica que pudiera ser también un buen marcador, principalmente en casos secundarios. La presencia de IgG en saliva y en orina nos permitiría

clasificar un caso como infección secundaria, ya que sólo son detectables en estas muestras cuando los niveles en el suero son elevados (Vázquez et al., 2007a).

### 2.3.2. Cinética de anticuerpos IgE totales y específicos a virus dengue en muestras de suero procedentes de pacientes con infección primaria o secundaria

A pesar de que la detección de anticuerpos IgE no ha sido empleada como método de diagnóstico algunos autores la señalan como un posible marcador pronóstico de desarrollo de la forma severa de la enfermedad. En este trabajo estudiamos la cinética de la IgE tanto total como específica en casos primarios y secundarios (figura 2.6)



**Figura 2.6.: Cinética de los anticuerpos IgE totales y específicos en muestras de suero (A casos primarios y B casos secundarios). El eje principal Y muestra la media aritmética de las relaciones DO + DE de la IgE específica. En el eje secundario Y se presenta la IgE total expresada como unidades internacionales por mL (UI/mL) (media+ DE).**

La cinética en los casos secundarios fue diferente a la observada en los primarios, con un incremento de los anticuerpos a partir del día 4 de comienzo de la fiebre. En estudios anteriores también fue observada la presencia de altos niveles de IgE en casos secundarios (Vázquez et al., 2005), lo que pudiera estar relacionado con un patrón predominante de respuesta celular Th2, favoreciendo el cambio de isotipo de Ig de  $\mu$  a  $\epsilon$  en las células B. Aunque el papel funcional de la IgE en las infecciones secundarias no está aún explorado, pudiera estar asociado con la activación de mastocitos induciendo mediadores inflamatorios y liberación de citoquinas (King et al., 2002).

Por otra parte, la IgE total se muestra en altos niveles tanto en primarios como en secundarios al compararse con los valores promedio de IgE reportados en la población cubana.

Por primera vez se realiza un estudio de cinética de varios marcadores serológicos en tres diferentes tipos de muestra, lo que ha permitido conocer su comportamiento y utilidad en el diagnóstico. La IgE pudiera también jugar un papel como marcador en infecciones secundarias (Vázquez et al., 2007a).

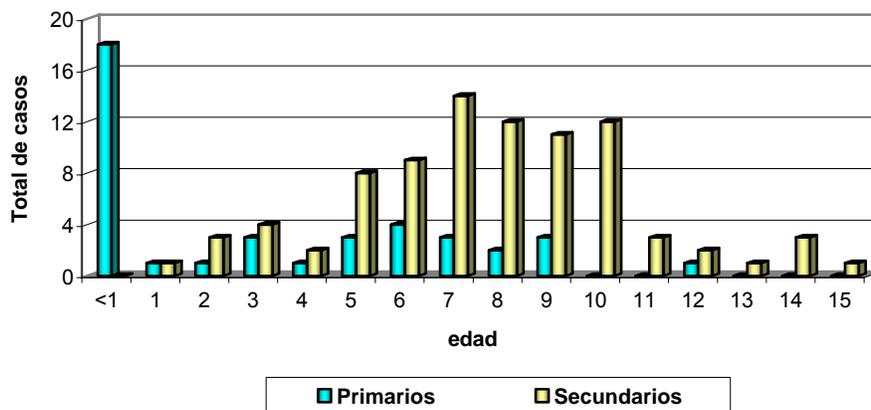
#### 2.4. Respuesta inmune humoral en niños con un cuadro clínico de FHD procedentes de Tegucigalpa, Honduras

El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune humoral en sueros procedentes de niños hospitalizados que presentaron un cuadro de FHD durante la epidemia ocurrida en Honduras entre los años 2004-2005.

##### 2.4.1. Casos primarios y secundarios con infección a virus dengue en relación con la edad

En el estudio fueron incluidos un total de 145 casos, de ellos 40 se pudieron clasificar como primarios con FHD grado de severidad I o II y 86 como casos secundarios, 73 como FHD grado I o II y 13 como FHD/SCD grado III o IV. Tres casos no pudieron ser clasificados según el tipo de infección y 16 fueron considerados negativos de respuesta de anticuerpos.

En la figura 2.7 se presenta la distribución de los 126 casos clasificados en primarios y secundarios según sus edades, donde se puede observar que el mayor número de casos primarios se encuentra en los niños menores de 1 año.



**Figura 2.7.: Distribución de casos primarios y secundarios a virus dengue por edades.**

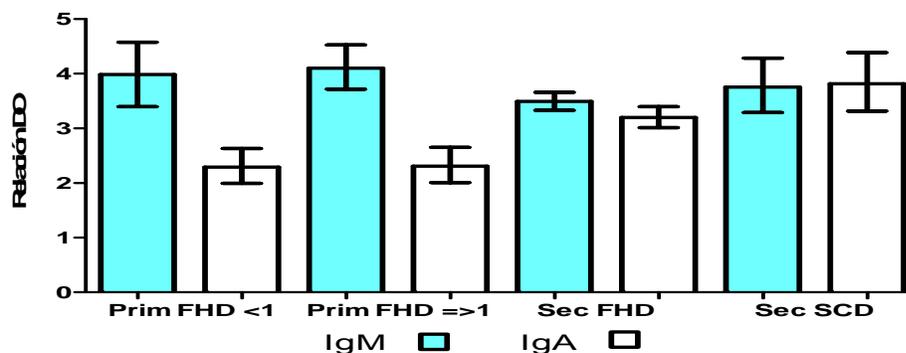
La ocurrencia de casos de FHD ha sido observada en pacientes con infección primaria y secundaria, aunque el mayor número de casos ha sido encontrado en las secundarias. Se ha reportado que la ocurrencia de FHD durante una infección primaria en niños < 1 año esta

relacionada con la presencia de anticuerpos pasivamente adquiridos de madres inmunes al virus dengue, lo que apoyaría la hipótesis del ADE. (Guzmán et al., 1986; Kliks et al., 1988; Kurane & Takasaki, 2001). Al nacer, los anticuerpos maternos protegen al niño de una infección por virus dengue, pero como los anticuerpos IgG son catabolizados, los niños tienen un periodo de riesgo de que se produzca el ADE si son infectados (Halstead, 2002). Esta situación podría explicar el número de casos < 1 año con FHD encontrados en este estudio, a pesar de que no pudimos estudiar la presencia de anticuerpos anti-dengue en las madres, consideramos que era posible que fueran positivas por la alta incidencia de dengue en Honduras.

Se ha observado que en las personas que tienen una infección secundaria por virus dengue, la edad es un factor de riesgo intrínscico para la permeabilidad vascular (Gamble et al., 2000). Durante la epidemia de Den-2 ocurrida en Cuba en 1981 se observó que el mayor porcentaje de casos graves con infección secundaria se encontraba en niños entre las edades de 3 a 4 años (Guzmán et al., 1984). En otros estudios se han observado resultados similares pero entre las edades de 5 a 9 años (Balmaseda et al., 2006; Halstead, 2006). El mayor número de casos secundarios, en nuestro estudio fue observado entre las edades de 5 a 10 años.

#### 2.4.2. Respuesta de anticuerpos IgM e IgA en casos primarios y secundarios.

En la figura 2.8 se presentan los resultados obtenidos con respecto a los anticuerpos IgM e IgA. La respuesta de anticuerpos IgM e IgA fue similar entre los grupos de casos primarios ( $p > 0.05$ ). La respuesta de anticuerpos IgM entre primarios y secundarios también fue similar, aunque estadísticamente se observaron diferencias entre los primarios  $\geq 1$  año y los secundarios FHD. La IgA mostró diferencia entre primarios y secundarios ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 2.8. Resultados de la respuesta de anticuerpos en IgM e IgA en cada grupo de estudio expresados como media de las relaciones de DO y el intervalo de confianza (95 %).**

Este es el primer estudio que relaciona la respuesta inmune humoral y la severidad de la infección a virus dengue en casos de niños hondureños (Lorenzana de Rivera et al., 2008).

### **Consideraciones:**

Los estudios presentados que involucran la respuesta inmune humoral en pacientes con un diagnóstico clínico de infección por dengue, utilizando diferentes marcadores serológicos y relacionados con el cuadro clínico y/o tipo de infección, sugieren las siguientes consideraciones:

- 1) Se observó un comportamiento similar en la respuesta de anticuerpos a pesar de las diferencias étnicas (cubanos y salvadoreños), etarias (niños y adultos) y de serotipos virales (Den-3 y Den-4).
- 2) La respuesta variable de anticuerpos IgM (baja o ausente), a que se hace referencia en la literatura para los casos secundarios, pudiera estar relacionada más con el cuadro clínico de la enfermedad que con el tipo de infección, siendo característico para los casos con FHD (estudio Cuba y El Salvador). La respuesta similar de los anticuerpos IgM entre primarios y secundarios con un cuadro de FHD (Honduras) apoya esta consideración.
- 3) Los menores niveles de anticuerpos IgM, IgA e IgE en casos secundarios FHD con respecto a los casos de FD pudieran estar relacionados con una mayor formación de inmunocomplejos virus-anticuerpo.
- 4) La detección de anticuerpos IgM en las muestras de saliva pudiera ser útil en aquellos casos donde la obtención de sangre venosa se hace difícil.
- 5) La detección de anticuerpos IgA en suero, saliva y orina pudiera funcionar como técnica complementaria de la IgM, teniendo en cuenta que se detecta principalmente en casos secundarios.
- 6) La presencia de IgG en saliva y orina nos permite clasificar un caso de infección secundaria.

- 7) La utilización del MAC-ELISA permite la identificación del serotipo infectante, lo cual sería de gran aplicación en aquellos laboratorios que no dispongan de condiciones para el aislamiento e identificación viral o para la realización del PCR.
- 8) La presencia de anticuerpos IgE se asocia a la infección secundaria.
- 9) La presencia de niños < 1 año con un cuadro de FHD apoya la teoría de la infección secuencial a través de los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente de madres inmunes a dengue.
- 10) La presencia de un mayor número de casos FHD/SCD con infección secundaria apoya la hipótesis de la infección secuencial como factor de riesgo de DH.

### **3. Estudios básicos relacionados con la proteína prM del virus dengue**

Desde hace varios años la OMS ha dirigido sus esfuerzos a la búsqueda de una vacuna para el dengue. El principal objetivo es definir epítopes que puedan estar involucrados en la protección y localizados en las principales proteínas diana de la respuesta inmune. Varios estudios han sido realizados para caracterizar la proteína E del virus dengue; sin embargo, la proteína prM, que también se expone en la envoltura ha sido menos estudiada.

Estudios realizados señalan dos formas de la proteína M en los flavivirus, la prM contenida en el virión inmaduro y la M contenida en el virión maduro extracelular. Se reporta que el precursor glicosilado prM da lugar a la M durante la etapa de maduración viral, evento que parece ser crucial y terminal en la maduración del virión para algunos flavivirus. El fragmento **pr** ha sido identificado solamente en el medio extracelular in vitro y su función in vivo permanece aún desconocida (Murray et al., 1993; Randolph et al., 1990).

Tanto prM como M confieren protección activa cuando se han expresado en virus vaccinia recombinante, no así el fragmento **pr**, destacándose además que la combinación de prM o M con la glicoproteína E en un mismo virus vaccinia recombinante confiere en general niveles de protección muy superiores a los alcanzados por cada proteína individualmente. Así mismo, determinados anticuerpos contra prM son capaces de proteger pasivamente en ratones (Bray & Lai, 1991; Bray et al., 1989)

Los péptidos sintéticos se encuentran entre las estrategias para el desarrollo de vacunas de nueva generación, pues representan una alternativa atractiva por la simplicidad de su empleo, la información que aportan sobre las dianas de la respuesta inmune protectora y las ventajas prácticas que pudieran ofrecer los productos obtenidos a partir de ellos. El uso de péptidos sintéticos ha llevado a establecer las bases moleculares de la antigenicidad de acuerdo a la conformación espacial y de las propiedades inmunológicas del antígeno involucrado. La utilización de ellos como parte de una vacuna de subunidad anti-dengue permitiría incluir en la formulación final epítopes protectores los cuales no produzcan la inmunoamplificación o alternativamente incluir péptidos protectores de cada uno de los 4 serotipos (Mathews et al., 1992; Roehrig et al., 1994).

Por la importancia que puede tener la proteína prM como diana de la respuesta inmune al virus dengue y el poco conocimiento que existe de la misma, nos propusimos hacer un estudio de la respuesta inmunológica tanto humoral como celular a esta proteína mediante la utilización de péptidos sintéticos.

**3.1. Predicción y diseño de péptidos antigénicos de la proteína prM del virus dengue:** Con la aplicación de varios programas, se realizó un análisis de predicción de regiones antigénicas para células B y epítopes de células T de esta proteína, fueron obtenidas tres secuencias aminoacídicas de interés. Utilizando como base dichas secuencias, se sintetizaron 5 péptidos. En la tabla 3.1 se presentan las secuencias aminoacídicas de los péptidos sintetizados. Los 4 primeros corresponden al segmento de la proteína **pr** y el último a la proteína M.

**Tabla 3.1. Diseño de péptidos antigénicos de la proteína prM del virus dengue**

<b>Código</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Región.</b>
B 19-6	LTTRNGEPHMIVMRQEKGKSLLFKTGDGV	3-31
B 20-2	CEDTITYKCPLLRQNEPEDIDCW	45-67
B 19-5	RQNEPEDIDWCNSTSTWVTYGTCTTTGEHRREKRS	57-92
B 20-1	NSTSTWVTYGTCTTTGEHRREKRSV	69-93
B 20-3	LETRTETWMSSEGAWKHAQRIE	103-124

A partir de la síntesis de los péptidos se realizaron varios estudios:

**3.2. Respuesta de anticuerpos anti-péptido por ELISA en suero de ratones inmunizados.**

Sueros de ratones inmunizados con péptidos conjugados y libres fueron probados mediante un ELISA indirecto. Estos resultados son mostrados en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Títulos de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con péptidos**

Péptidos	Título de anticuerpos					
	Anti-péptido conjugado (% de ratones <sup>a</sup> )				Anti-péptidos libre (% de ratones <sup>b</sup> )	
	100	1 000	10 000	100 000	100	1 000
<b>B 19-6</b>	10	5	70	15	60	40
<b>B 20-2</b>	0	10	65	25	40	60
<b>B 19-5</b>	5	40	55	0	80	20
<b>B 20-1</b>	5	10	60	25	40	60
<b>B 20-3</b>	10	15	70	5	40	60

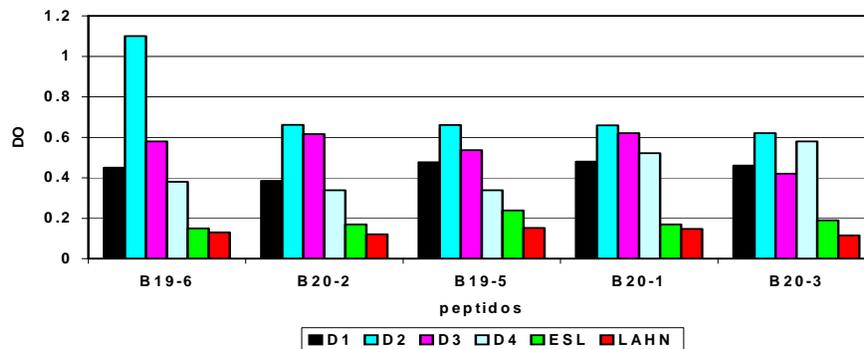
<sup>a</sup> número de ratones =20

<sup>b</sup> número de ratones = 5

Altos títulos de anticuerpos (por encima de 10 000) fueron encontrados en los ratones inmunizados con péptidos conjugados. Los títulos en los sueros de ratones inmunizados con péptidos libres fueron sustancialmente más bajos (1 000 o menor), pero detectables, demostrando la presencia de epítopes para células B en los péptidos (Vázquez et al., 1998a; Vázquez et al., 2002).

### 3.3. Reconocimiento in vitro de los péptidos por anticuerpos producidos contra el virus en ratones

Líquidos Ascíticos Hiperinmunes (LAH), producidos en ratones Balb/c contra los cuatro serotipos del dengue, fueron enfrentados a los péptidos utilizando el mismo ELISA de detección de anticuerpos anti-péptidos. Se incluyó también el virus de la encefalitis de San Luis (ESL) y un LAH negativo como control. Los resultados se muestran en la figura 3.1.



**Figura 3.1. Respuesta de los LAH a dengue, ESL y LAHN frente a los péptidos por ELISA**

Todos los LAH contra los cuatro serotipos reconocieron los péptidos. No se observó reacción contra el LAH a ESL (Vázquez et al., 1998a; Vázquez et al., 2002).

### 3.4. Reconocimiento in vitro de los péptidos por anticuerpos producidos contra el virus en pacientes diagnosticados clínica y serológicamente como infectados por dengue

En la figura 3.2. se presentan los porcentajes de positividad obtenidos mediante un ELISA indirecto al enfrentar 118 sueros de pacientes de dengue procedentes de las epidemias de: Cuba 1981 (serotipo 2) (Kourí et al., 1983b), Costa Rica de 1994 (serotipos 1 y 4) y Panamá 1993 (serotipo 2) (OPS, 1997) a los cinco péptidos. El reconocimiento de los diferentes péptidos sintéticos por los anticuerpos anti-dengue apoya la presencia de epítopes de células B humanas en dichos péptidos (Vázquez et al., 1998a).

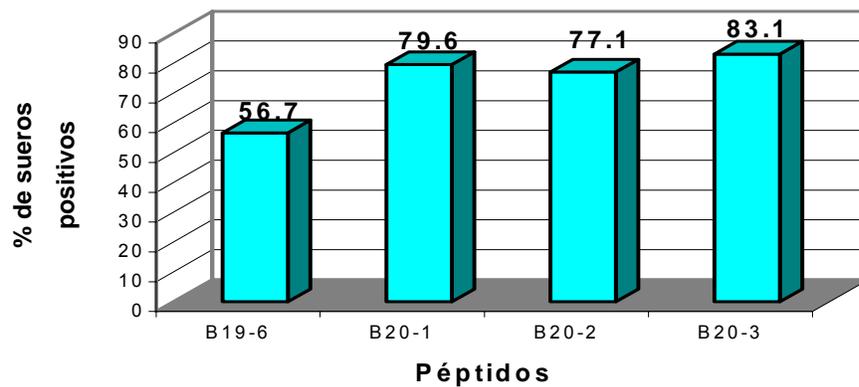


Figura 3.2. Porcentaje de sueros positivos a cada péptido

### 3.5. Prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PNRP)

Sueros anti-péptido fueron testados por la PNRP contra el virus dengue 2. Aquellos que resultaron positivos fueron trabajados contra el resto de los serotipos. Sólo se observó capacidad neutralizante cruzada en los anticuerpos presentes en sueros de animales inmunizados con los péptidos B 19-6 y B 20-3. En la tabla 3.3. se presentan estos resultados (Vázquez et al., 1998a; Vázquez et al., 2002).

Tabla 3.3.: Título de anticuerpos neutralizantes anti-péptidos

PÉPTIDO	Título de anticuerpos Neutralizantes			
	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
B 19-6	100	180	60	160
B 20-3	110	80	80	80

### 3.6. Protección frente al reto viral:

Ratones inmunizados con los diferentes péptidos fueron retados por vía intracerebral con el virus serotipo 2 cepa A15 (Guzmán et al., 1995). Los resultados mostraron que en los ratones inmunizados con los péptidos B 19-6, B 20-1 y B 19-5 se obtuvo protección frente al reto viral, induciendo un nivel de protección estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) (figura 3.3.) y solamente uno tenía actividad neutralizante (B19-6).

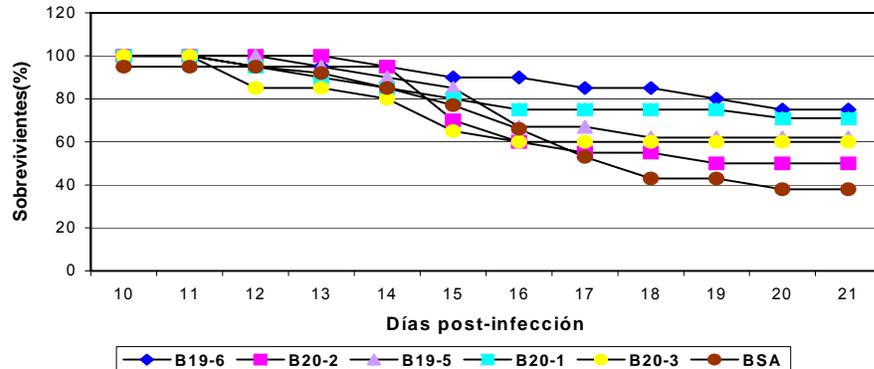


Figura 3.3. Respuesta de los ratones Balb/c inmunizados con péptidos frente al reto viral

### 3.7. Respuesta linfoproliferativa de células T en ratones Balb/c inmunizados con los péptidos.

Se demostró una respuesta significativa proliferativa a virus dengue en los linfocitos de los bazos de los ratones Balb/c inmunizados con los péptidos B 19-6, B 20-1, B 19-5, y B 20-3, determinándose en ellos presencia de epítopes para células T murinas (figura 3.4.) (Vázquez et al., 1998a; Vázquez et al., 2002).

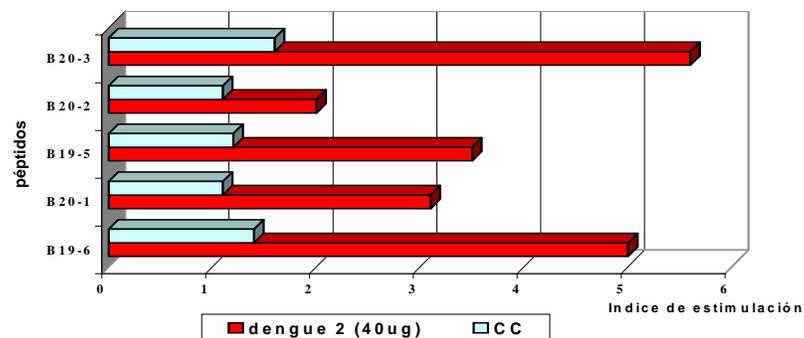


Figura 3.4.: Respuesta linfoproliferativa a virus Den-2 de células de bazos de ratones inmunizados con péptidos.

### **Consideraciones:**

Los diferentes estudios realizados que involucran la respuesta inmunológica, tanto humoral como celular a la proteína prM del virus dengue, mediante la utilización de péptidos sintéticos, permite señalar las siguientes consideraciones:

1. Se define por primera vez a nivel mundial secuencias aminoacídicas de la proteína prM del virus dengue involucradas en el reconocimiento de células B y T.
2. Se reporta, también por primera vez, la presencia de secuencias de la proteína capaces de generar anticuerpos con capacidad neutralizante frente al virus.
3. Se evidencia la presencia del precursor de membrana prM en el virión maduro sugerido por otros autores con anterioridad.
4. Se brindan nuevos aportes al conocimiento de esta proteína, demostrando la presencia de epítopes secuenciales de células B y T a virus dengue, así como la importancia y relevancia de esta proteína en la respuesta inmune.
5. Estos resultados deben tenerse en cuenta para el desarrollo de nuevas estrategias en la obtención de una vacuna.

### **4. Consideraciones generales**

Todos los resultados, presentados de forma resumida en este documento, han contribuido al desarrollo del diagnóstico serológico del dengue en Cuba y en otros países de la región, permitiendo un gran avance en la vigilancia y control de la enfermedad, así como profundizar en la temática relativa a la respuesta inmune humoral en humanos y adquirir además nuevos conocimientos sobre el papel de la proteína prM como diana de la respuesta inmune. Sin embargo, aún queda mucho por conocer y por aprender, ya que la búsqueda de métodos rápidos, fáciles de ejecutar, económicos y que brinden un diagnóstico temprano continúa siendo un reto. Mantener las investigaciones sobre la patogenia de esta enfermedad constituye también un desafío para poder lograr una vacuna segura y eficaz contra el dengue.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, N. (2006) Estudios de la respuesta de anticuerpos IgG en diferentes grupos poblacionales. Tesis de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V. and Flamand, M. (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40(2), 376-81.
- Allison, S.L., Stadler, K., Mandl, C.W., Kunz, C. and Heinz, F.X. (1995) Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol* 69(9), 5816-20.
- Balmaseda, A., Guzmán, M.G., Hammond, S., Robleto, G., Flores, C., Tellez, Y., Videa, E., Saborio, S., Perez, L., Sandoval, E., Rodriguez, Y. and Harris, E. (2003) Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(2), 317-22.
- Balmaseda, A., Hammond, S.N., Perez, L., Tellez, Y., Saborio, S.I., Mercado, J.C., Cuadra, R., Rocha, J., Perez, M.A., Silva, S., Rocha, C. and Harris, E. (2006) Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestations of Dengue. *Am J Trop Med Hyg* 74(3), 449-456.
- Barrero, R. (2007) La Proteína NS1 como marcador de infección temprana para el diagnóstico virológico del virus dengue. Diploma, Facultad de Biología.
- Bazan, J.F. and Fletterick, R.J. (1989) Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171(2), 637-9.
- Bhakdi, S. and Kazatchkine, M.D. (1990) Pathogenesis of dengue: an alternative hypothesis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21(4), 652-7.
- Bhamarapavati, N. and Sutee, Y. (2000) Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 18 Suppl 2, 44-7.
- Branch, S.L. and Levett, P.N. (1999) Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(4), 555-7.
- Bravo, J.R., Guzmán, M.G. and Kourí, G.P. (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5), 816-20.
- Bray, M. and Lai, C.J. (1991) Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology* 185(1), 505-8.
- Bray, M., Zhao, B.T., Markoff, L., Eckels, K.H., Chanock, R.M. and Lai, C.J. (1989) Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J Virol* 63(6), 2853-6.
- Butrapet, S., Rabablert, J., Angsubhakorn, S., Wiriyarat, W., Huang, C., Kinney, R., Punyim, S. and Bhamarapavati, N. (2002) Chimeric dengue type 2/type 1 viruses induce immune

- responses in cynomolgus monkeys. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33(3), 589-99.
- Castellanos, Y. (2005) Estudio de la respuesta inmune humoral en niños salvadoreños con infección a virus dengue 4. Diploma, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. and Rice, C.M. (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology* 44, 649-88.
- Chang, G.J., Kuno, G., Purdy, D.E. and Davis, B.S. (2004) Recent advancement in flavivirus vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 3(2), 199-220.
- Clark, D.H. and Casals, J. (1958) Techniques for hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Am. J. Trop. Hyg.* 7, 561-573.
- Cuzzubbo, A.J., Endy, T.P., Nisalak, A., Kalayanarooj, S., Vaughn, D.W., Ogata, S.A., Clements, D.E. and Devine, P.L. (2001) Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(6), 1150-5.
- Cuzzubbo, A.J., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Solomon, T., Kalayanarooj, S., Aaskov, J., Dung, N.M. and Devine, P.L. (2000) Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and venture technologies dengue IgM and IgG dot blot. *J Clin Virol* 16(2), 135-44.
- Delgado, I., Vázquez, S., Bravo, J.R. and Guzmán, M.G. (2002) Predicción del serotipo del virus del dengue mediante la respuesta de anticuerpos IgM. *Rev. Cub. Med. Trop.* 54(2), 113-117.
- Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M.R., Rodrigues, S.G., Storck-Herrmann, C., Cesaire, R., Morvan, J., Flamand, M. and Baril, L. (2006) Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*.
- Edelman, R. (2007) Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1, S56-60.
- Fernández, R.J. and Vázquez, S. (1990) Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(3), 347-51.
- Gamble, J., Bethell, D., Day, N.P., Loc, P.P., Phu, N.H., Gartside, I.B., Farrar, J.F. and White, N.J. (2000) Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clin Sci (Lond)* 98(2), 211-6.
- Groen, J., Koraka, P., Velzing, J., Copra, C. and Osterhaus, A.D. (2000) Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(6), 867-71.
- Gubler, D.J. (1996) Arboviruses as imported disease agents: the need for increased awareness. *Arch Virol Suppl* 11, 21-32.
- Gubler, D.J. (1998a) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11(3), 480-96.
- Gubler, D.J. (1998b) The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* 27(2), 227-34.

- Guirakhoo, F., Weltzin, R., Chambers, T.J., Zhang, Z.X., Soike, K., Ratterree, M., Arroyo, J., Georgakopoulos, K., Catalan, J. and Monath, T.P. (2000) Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol* 74(12), 5477-85.
- Guzmán, M.G. (1998) [Advances in the development of a vaccine against dengue]. *Acta Cient Venez* 49 Suppl 1, 38-45.
- Guzmán, M.G., Deubel, V., Pelegrino, J.L., Rosario, D., Marrero, M., Sariol, C. and Kourí, G. (1995) Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 52(3), 241-6.
- Guzmán, M.G. and Kourí, G. (2002) Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2(1), 33-42.
- Guzmán, M.G. and Kourí, G. (2004) Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 8(2), 69-80.
- Guzmán, M.G., Kourí, G., Bravo, J., Soler, M., Morier, L., Vázquez, S., Diaz, A., Fernández, R., Ruiz, A., Ramos, A. and et al. (1986) Dengue in Cuba: history of an epidemic. *PAHO Bulletin* 20(1), 24-30.
- Guzmán, M.G., Kourí, G. and Halstead, S.B. (2000) Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet* 355(9218), 1902-3.
- Guzmán, M.G., Kourí, G.P., Bravo, J., Soler, M., Vázquez, S., Santos, M., Villaescusa, R., Basanta, P., Indan, G. and Ballester, J.M. (1984) Dengue haemorrhagic fever in Cuba. II. Clinical investigations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78(2), 239-41.
- Guzmán, M.G., Mune, M. and Kourí, G. (2004) Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2(6), 895-911.
- Halstead, S.B. (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42(5), 350-62.
- Halstead, S.B. (2002) Dengue. *Curr Opin Infect Dis* 15(5), 471-6.
- Halstead, S.B. (2006) Dengue in Americas and Southeast Asia: Do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 20, 407-414.
- Hatch, S., Mathew, A. and Rothman, A. (2008) Dengue vaccine: opportunities and challenges. *IDrugs* 11(1), 42-5.
- Heinz, F.X., Allison, S.L., Stiasny, K., Schalich, J., Holzmann, H., Mandl, C.W. and Kunz, C. (1995) Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 13(17), 1636-42.
- Henchal, E.A., McCown, J.M., Seguin, M.C., Gentry, M.K. and Brandt, W.E. (1983) Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 32(1), 164-9.
- Henchal, E.A. and Putnak, J.R. (1990) The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3(4), 376-96.
- Herrera, R.C., Acosta, C., Melchor, A., Alonso, V., Solis, R.L. and Vázquez, S. (2005) UltramicroELISA para la detección de anticuerpos IgM anti-dengue con reactivos listos para su uso. *Rev. Biomed.* 16, 1-13.

- Hombach, J. (2007) Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Publica* 21(4), 254-60.
- Huang, C.Y., Butrapet, S., Pierro, D.J., Chang, G.J., Hunt, A.R., Bhamarapavati, N., Gubler, D.J. and Kinney, R.M. (2000) Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol* 74(7), 3020-8.
- Huang, C.Y., Butrapet, S., Tsuchiya, K.R., Bhamarapavati, N., Gubler, D.J. and Kinney, R.M. (2003) Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 77(21), 11436-47.
- Hunsperger, E., Yoksan, S., Buchy, P., Nguyen, V.C., Devi, S., D., E., Pelegriño, J.L., Vázquez, S., Artsob, H., Gubler, D., Halstead, S., Guzmán, M.G., Margolis, H., Nathanson, C.M., Rizzo, N., Bessoff, K., Kliks, S. and Peeling, R.W. (2008) Evaluation of commercially available dengue IgM tests by a WHO/PDVI Laboratory Network. *Emerg Infect Dis* (en revisión).
- Innis, B.L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P. and Hoke, C.H. (1989) An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40(4), 418-27.
- Kao, C.L., King, C.C., Chao, D.Y., Wu, H.L. and Chang, G.J. (2005) Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect* 38(1), 5-16.
- King, C.A., Anderson, R. and Marshall, J.S. (2002) Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol* 76(16), 8408-19.
- Kliks, S.C., Nimmanitya, S., Nisalak, A. and Burke, D.S. (1988) Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 38(2), 411-9.
- Koraka, P., Suharti, C., Setiati, T.E., Mairuhu, A.T., Van Gorp, E., Hack, C.E., Juffrie, M., Sutaryo, J., Van Der Meer, G.M., Groen, J. and Osterhaus, A.D. (2001) Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* 39(12), 4332-8.
- Kourí, G., Guzmán, M.G. and Bravo, J.R. (1983a) [Criteria used during the hemorrhagic dengue outbreak to define positive cases and primary and secondary responses to the hemagglutination inhibition test. Cuba 1981]. *Rev Cubana Med Trop* 35(1), 4-10.
- Kourí, G., Guzmán, M.G., Valdés, L., Carbonel, I., del Rosario, D., Vázquez, S., Laferte, J., Delgado, J. and Cabrera, M.V. (1998) Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 4(1), 89-92.
- Kourí, G., Mas, P., Guzmán, M.G., Soler, M., Goyenechea, A. and Morier, L. (1983b) Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *Bull Pan Am Health Organ* 17(2), 126-32.
- Kourí, G.P., Guzmán, M.G. and Bravo, J.R. (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5), 821-3.

- Kuno, G., Gomez, I. and Gubler, D.J. (1991) An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 33(1-2), 101-13.
- Kurane, I. and Takasaki, T. (2001) Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol* 11(5), 301-11.
- Laferte, J., Plegrino, J.L., Guzmán, M.G., Gonzalez, G., Vázquez, S. and Hermida, C. (1992) Rapid diagnosis of dengue virus infection using a novel 10UI IgM antibody capture ultramicroELISA assay (MAC-UMELISA Dengue). *Adv. Modern Biotechnol* 1(19.4).
- Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J. and Vorndam, A.V. (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(3), 545-51.
- Libraty, D.H., Endy, T.P., Houn, H.S., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Chansiriwongs, W., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A. and Rothman, A.L. (2002) Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 185(9), 1213-21.
- Lorenzana de Rivera, I., Parham, L., Murillo, W., Moncada, W. and Vázquez, S. (2008) Humoral Immune Response of Dengue Hemorrhagic Fever Cases In Children From Tegucigalpa, Honduras. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. aceptada.
- Mas, P. (1978) Dengue fever in Cuba in 1977. *PAHO* 375, 40-43.
- Mathews, J.H., Roehrig, J.T., Brubaker, J.R., Hunt, A.R. and Allan, J.E. (1992) A synthetic peptide to the E glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus defines multiple virus-reactive T- and B-cell epitopes. *J Virol* 66(11), 6555-62.
- Monath, T.P. (1997) Early indicators in acute dengue infection. *Lancet* 350(9093), 1719-20.
- Monath, T.P. and Heinz, F.X. (1996) Flaviviruses. In: B.N. Fields (Ed), *Virology*, Vol. 1, Lippincott-Raven, Philadelphia-New York, pp. 961-1034.
- Murray, J.M., Aaskov, J.G. and Wright, P.J. (1993) Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol* 74(Pt 2), 175-82.
- Murthy, H.M., Clum, S. and Padmanabhan, R. (1999) Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *J Biol Chem* 274(9), 5573-80.
- Nawa, M., Yamada, K.I., Takasaki, T., Akatsuka, T. and Kurane, I. (2000) Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(5), 774-7.
- OPS. (1997) Resurgimiento del Dengue en las Américas. *Boletín Epidemiológico* 18, 1-6.
- Osatomi, K. and Sumiyoshi, H. (1990) Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology* 176(2), 643-647.
- PAHO. (1994) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Scientific Publication, Pan American Health Organization 548.
- PAHO. (2000) *Dengue in Central America: the epidemics of 2000*. *Epidemiol Bull* 21(4), 4-8.

- Pelaez, O., Guzmán, M.G., Kourí, G., Pérez, R., Martín, J.L.S., Vázquez, S., Rosario, D., Mora, R., Quintana, I., Bisset, J., Cancio, R., Masa, A.M., Castro, O., González, D., Avila, L.C., Rodríguez, R., Alvarez, M., Pelegrino, J.L., Bernardo, L. and Prado, I. (2004) Dengue 3 epidemic in Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* 10(4), 219-222.
- Perez, A.B., Garcia, G., Sierra, B., Alvarez, M., Vázquez, S., Cabrera, M.V., Rodriguez, R., Rosario, D., Martinez, E., Denny, T. and Guzmán, M.G. (2004) IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* 73(2), 230-4.
- Randolph, V.B., Winkler, G. and Stollar, V. (1990) Acidotropic-amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* 174(2), 450-458.
- Roehrig, J.T., Risi, P.A., Brubaker, J.R., Hunt, A.R., Beaty, B.J., Trent, D.W. and Mathews, J.H. (1994) T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 198(1), 31-8.
- Rosario, D., Alvarez, M., Diaz, J., Contreras, R., Rodriguez, R., Vázquez, S. and Guzmán, M.G. (1998) Reaccion en cadena de la polimerasa para la deteccion rapida y determinacion del serotipo de virus del dengue en muestras clinicas. [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica* 4(1), 1-5.
- Rosen, L. (1977) The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26(3), 337-43.
- Rosen, L. (1986) The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S Afr Med J Suppl*, 40-2.
- Rothman, A.L. (2003) Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* 60, 397-419.
- Shu, P.Y., Chen, L.K., Chang, S.F., Yueh, Y.Y., Chow, L., Chien, L.J., Chin, C., Lin, T.H. and Huang, J.H. (2003) Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4), 622-30.
- Shu, P.Y. and Huang, J.H. (2004) Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(4), 642-50.
- Stephenson, J.R. (2005) Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* 83(4), 308-14.
- Stephenson, J.R. (2006) Developing vaccines against flavivirus diseases: past success, present hopes and future challenges. *Novartis Found Symp* 277, 193-201; discussion 201-5, 251-3.
- Takasaki, T., Nawa, M., Yamada, K.I., Harada, M., Takeda, A. and Kurane, I. (2002) Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *J Virol Methods* 102(1-2), 61-6.

- Talarmin, A., Labeau, B., Lelarge, J. and Sarthou, J.L. (1998) Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol* 36(5), 1189-92.
- Teles, F.R., Prazeres, D.M. and Lima-Filho, J.L. (2005) Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol*.
- Valdés, L., Guzmán, M.G., Kourí, G., Delgado, J., Carbonell, I., Cabrera, M.V., Rosario, D. and Vázquez, S. (1999) La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. [Epidemiology of dengue and hemorrhagic dengue in Santiago, Cuba 1997]. *Rev Panam Salud Publica* 6(1), 16-25.
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A. and Nisalak, A. (2000) Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181(1), 2-9.
- Vaughn, D.W., Nisalak, A., Solomon, T., Kalayanarooj, S., Nguyen, M.D., Kneen, R., Cuzzubbo, A. and Devine, P.L. (1999) Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 60(4), 693-8.
- Vázquez, S., Acosta, N., Ruiz, D., Calzada, N., Alvarez, A.M. and Guzmán, M.G. (2008) Immunoglobulin G Antibody Response in Children and Adults with Dengue Acute Infection. *Journal Virological Methods* (en revisión).
- Vázquez, S., Bravo, J., Pérez, A.B. and Guzmán, M.G. (1997a) ELISA de Inhibición . Una alternativa en el estudio serológico de los casos de dengue. *Boletín Epidemiológico OPS* 18(2), 7-8.
- Vázquez, S., Bravo, J.R., Perez, A.B. and Guzmán, M.G. (1997b) [Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue]. *Rev Cubana Med Trop* 49(2), 108-12.
- Vázquez, S., Cabezas, S., Perez, A.B., Pupo, M., Ruiz, D., Calzada, N., Bernardo, L., Castro, O., Gonzalez, D., Serrano, T., Sanchez, A. and Guzmán, M.G. (2007a) Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *IJID* 11, 256-262.
- Vázquez, S. and Fernández, R. (1989) [Use of an inhibition method of ELISA in the serologic diagnosis of dengue. Preliminary report]. *Rev Cubana Med Trop* 41(1), 18-26.
- Vázquez, S., Guzmán, M.G. and Guillen, G. (1998a) Epítopes of the protein prM/M of dengue virus, synthetic peptides, Oficina Cubana de Propiedad Industrial (OCPI), WO1998CU00001 19980113, Cuba.
- Vázquez, S., Guzmán, M.G., Guillen, G., China, G., Perez, A.B., Pupo, M., Rodriguez, R., Reyes, O., Garay, H.E., Delgado, I., Garcia, G. and Alvarez, M. (2002) Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine* 20(13-14), 1823-30.
- Vázquez, S., Hafner, G., Ruiz, D., Calzada, N. and Guzmán, M.G. (2007b) Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *J Clin Virol* 39(3), 194-8.

- Vázquez, S., Lemos, G., Pupo, M., Ganzon, O., Palenzuela, D., Indart, A. and Guzmán, M.G. (2003a) Diagnosis of dengue virus infection by the visual and simple AuBioDOT immunoglobulin M capture system. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(6), 1074-7.
- Vázquez, S., Perez, A.B., Ruiz, D., Rodriguez, R., Pupo, M., Calzada, N., González, L., González, D., Castro, O., Serrano, T. and Guzmán, M.G. (2005) Serological markers during Dengue 3 primary and secondary infections. *J. Clin. Virol.* 33(2), 132-137.
- Vázquez, S., Saenz, E., Huelva, G., Gonzalez, A., Kourí, G. and Guzmán, M. (1998b) Deteccion de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Publica* 3(3), 174-8.
- Vázquez, S., Valdés, O., Pupo, M., Delgado, I., Alvarez, M., Pelegrino, J.L. and Guzmán, M.G. (2003b) MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 110(2), 179-84.
- Vázquez, S., Valdivia, I., Sánchez, A., Calzada, N. and Guzmán, M.G. (2007c) Evaluación del sistema diagnóstico UMELISA DENGUE IgM PLUS. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* (Aceptada).
- WHO. (1997) Dengue Hemorrhagic Fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 1-84.
- WHO. (1999) Strengthening implementation of the global strategy for dengue/dengue hemorrhagic fever prevention and control. Headquarters World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Yamshchikov, V.F. and Compans, R.W. (1994) Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol* 68(9), 5765-71.
- Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C. and Halloran, W. (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38(3), 1053-7.

**PUBLICACIONES, TESIS Y PATENTE CORRESPONDIENTES A LAS  
PRINCIPALES INVESTIGACIONES PRESENTADAS (1997-2008)**

**Publicaciones (ver anexo):**

1. **S.Vázquez**, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán. ELISA de Inhibición su utilidad para clasificar un caso de dengue. Rev.Cub. Med. Trop. 49(2), 108-12, 1997.
2. **S. Vázquez**, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán. Inhibition ELISA. An alternative in the serological study of cases of dengue. Bol. Epidem. OPS vol 18, No 2 pag. 7-8, 1997.
3. **S. Vázquez**, MG. Guzmán y col. Detección de IgM contra virus del dengue en sangre total absorbida en papel de filtro. Rev. Pan. Salud Pub. Pan. Am. J. Pub. Health. vol 3 No 3 1998.
4. I Delgado, **S Vázquez\***, JR Bravo, María G Guzmán. Predicción del serotipo del virus del dengue mediante la respuesta de anticuerpos IgM. Rev. Cub. Med. Trop. No 2, 2002.
5. **S Vázquez**, M G Guzmán, G Guillen, G Chinae, AB Pérez, M Pupo, R Rodríguez, O Reyes, H E Garay, I Delgado, G García, M Álvarez. Immune response to synthetic peptides of the PrM protein of dengue virus in immunized mice. Vaccine; 20:1823-30: 2002.
6. **S Vázquez**, O Valdés, M Pupo, I Delgado, M Álvarez, JL Pelegrino and MG Guzmán. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies in Yellow fever after vaccination. J Virol Methods Jun; 110(2):179-84, 2003.
7. **S. Vázquez**, G. Lemos, M Pupo, O Ganzón, D Palenzuela, A. Indart, MG Guzmán. Diagnosis of Dengue Virus infection by the Visual and Simple AuBioDOT Immunoglobulin M Capture System. Clin. Diagn. Lab. Immunol. Vol 10 (60): 1074-77. 2003..
8. **S Vázquez**, AB Pérez., D Ruiz., R Rodríguez, M Pupo, N Calzada, L González, D González, O Castro, T Serrano, M G Guzmán. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. 2005, 33(2): 132-137.
9. **S. Vázquez**, S. Cabezas, A.B. Pérez, M. Pupo, D. Ruiz, N. Calzada, L. Bernardo, O. Castro, D. González, T. Serrano, A Sanchez, M. G. Guzmán. Kinetics of antibodies in sera, saliva and urine samples from adult patients with primary or secondary infection to dengue 3 virus. International Journal Infection Disease International Journal Infectious Disease 11: 256-262, 2007.
10. **S Vázquez**, G Hafner, D Ruiz, N Calzada, MG Guzmán. JCV 39: 194-198, 2007. Evaluation of Immunoglobulin M and G Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Panbio Kits for Diagnostic Dengue Infections.
11. **S. Vázquez**, I. Valdivia, A. Sanchez, N. Calzada, MG. Guzmán. Evaluación del sistema diagnóstico UMELISA Dengue IgM PLUS. Archivos Venezolanos de Medicina Tropical (aceptada) 2008.

12. I Lorenzana De Rivera, L Parham, W Murillo, W Moncada, **S Vázquez\***. Humoral Immune Response of Dengue Hemorrhagic Fever Cases In Children From Tegucigalpa, Honduras. AJTMH 79(2), 262-266, 2008.
13. E. Hunsperger, S. Yoksan, P. Buchy, V.C. Nguyen, S. Devi, J.L. Pelegrino, S. **Vázquez**, H. Artsob, D. Gubler, S. Halstead, M.G. Guzman, H. Margolis, C.M. Nathanson, N. Rizzo, K. Bessoff, K., Kliks, S. and Peeling, R.W. Evaluation of commercially available dengue IgM tests by a WHO/PDVI Laboratory Network. Emerg Infect Dis, Vol 5 (1), 2007.
14. **S. Vázquez**, N. Acosta, D. Ruiz, N. Calzada, A. M. Alvarez, M. G. Guzman Immunoglobulin G Antibody Response in Children and Adults with Dengue 3 Acute Infection. Journal Virological Methods, 2009 (aceptada).

\* **Autor correspondiente.**

**Tesis (ver anexo):**

1. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular a peptidos sintéticos de la proteína prM del virus dengue 2 en ratones. Alumna Tahimi Arbolea, Especialidad Microbiología, Facultad de Biología, UH. Tutora, 1997
2. Estudio de la respuesta inmune en ratones Balb/c inducida por antígenos peptídicos múltiples de la proteína prM del virus dengue. Aspirante Lic Iselys Delgado Hernández, Maestría en Virología, IPK. Tutora, 1999
3. Evaluación de la respuesta de anticuerpos al virus de la fiebre amarilla en vacunados mediante dos sistemas inmunoenzimáticos. Aspirante Lic. Odaya Valdés Valdés. Maestría en Virología, IPK. Tutora, 1999
4. Estudio de diferentes marcadores serológicos en pacientes con infección por dengue. Alumno Didye Ruiz, Especialidad Microbiología, Facultad de Biología, UH. Tutora, 2004
5. Estudio de la cinética de anticuerpos en diferentes muestras de pacientes con infección por virus dengue 3. Aspirante Lic. Sheila Cabezas Maestría en Virología. Tutora, 2004.
6. Respuesta inmune humoral en niños salvadoreños con infección a virus dengue 4. Alumna Yinet Castellanos, Instituto Farmacia-Alimentos. Tutora, 2005
7. Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG a virus dengue en diferentes grupos poblacionales. Alumna Nadia Acosta Núñez de la Facultad de Biología de la Especialidad de Microbiología, UH. Tutora, 2006.
8. La proteína NS1 como posible marcador temprano para el diagnóstico virológico del dengue. Alumno Rafael Barrero, Especialidad de Microbiología, Facultad de Biología, UH. Tutora, 2007

**Patente (ver anexo):**

Epítopes of the protein prM/M of dengue virus, synthetic peptides. Publication date: 1998-07-23 Inventor(s): **S. Vázquez**, MG Guzmán, G. Guillen et al. Requested Patent: WO9831814 A 19980723 Application Number: WO1998CU00001 19980113. Priority Number(s): CU19970000013 19970115. IPC Classification: C12N15/40; C07K14/18; A61K39/12; C07K16/10