

1 9 8 6 - 2

CODIGO 079274712

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DEL DENGUE EN ALGUNAS
POBLACIONES DEL ESTADO DE MORELOS.**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ANABELL ALVARADO NAVARRO
GUADALAJARA, JALISCO 1989

I N D I C E

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y METODOS	
A.- Características de la zona estudiada....	22
B.- Obtención de los sueros.....	23
C.- Tratamiento de los sueros.....	24
D.- Determinación de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.....	25
E.- Preparación del antígeno.....	26
F.- Titulación del antígeno por la técnica - de la hemaglutinación.....	28
G.- Cultivo celular.....	29
H.- Aislamiento viral mediante inmunofluores cencia directa.....	29
I.- Identificación del serotipo mediante in- munofluorescencia indirecta.....	31
RESULTADOS.....	33
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS.	

RESUMEN

Se analizaron 94 muestras de pacientes con sintomatología compatible con dengue, las cuales fueron colectadas en 1987 de 27 localidades del Estado de Morelos, a dichas muestras se les determinó el título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y aisló e identificó el serotipo viral en cultivos de células de mosquito. La identificación se hizo empleando anticuerpos monoclonales mediante la técnica de inmunofluorescencia.

El 91.4% de las muestras (47.8% del sexo femenino y 43.6% del sexo masculino) fueron positivas para IH. Se encontró que el 89.0% de los sueros fueron positivos contra el serotipo 4, mientras que el 42.3%, 17.7% y 49.0% de las muestras presentaron títulos IH contra los serotipos 1, 2 y 3 respectivamente.

Fue posible aislar el virus en 11 casos (11.7%) de éstos el 63.6% correspondió al serotipo 4, siendo la primera vez que se reporta en esta entidad, en tanto que el 18.1% se encontró en los serotipos 1 y 2 en igual proporción. La mayoría de los aislamientos provenían de la zona Suroeste del Estado.

Se observó que el grupo más afectado fue el de 16-30 años de edad; además de un ligero predominio del sexo femenino --

(47.8%), y se encontró que un 12.7% de los pacientes presentaron manifestaciones hemorrágicas, en tanto que la mayoría refirieron los signos leves de la enfermedad.

I N T R O D U C C I O N

Actualmente el dengue constituye un problema de salud pública, no solo en nuestro país sino en el mundo entero. A pesar de las grandes campañas antiaédicas que se han llevado a cabo no ha sido posible erradicar el vector, el cual se encuentra distribuido en muchas regiones tropicales y subtropicales del planeta.

En nuestro país, esta virosis es causa de índices elevados de ausentismo escolar y laboral, afectando el estado socioeconómico familiar y por ende el de la República. Además es importante señalar que en el año de 1987 se reportaron casos de dengue en toda la República Mexicana, con excepción de los Estados de Hidalgo, Tlaxcala y Baja California Norte. Así pues este trabajo surgió de la inquietud por conocer el problema del dengue y al mismo tiempo señalar el riesgo de que ocurran casos de dengue hemorrágico en la población susceptible.

Se seleccionó el Estado de Morelos para realizar el presente trabajo debido a sus características climatológicas, hidrográficas y geográficas ya que proporcionan las condiciones adecuadas para el desarrollo del vector, además su economía constituye un factor importante en la diseminación del virus, por el transporte activo existente entre dicha entidad y los Estados colindantes. También se tomaron en

consideración los antecedentes que se tienen en los últimos cinco años, y la confirmación de cuatro casos de dengue hemorrágico en 1987 en ese Estado.

A N T E C E D E N T E S

El dengue es una enfermedad sistemática del hombre causada por alguno de los cuatro serotipos del virus del mismo nombre, pertenecientes a la familia Flaviviridae (1), el virus es transmitido al hombre por la picadura de la hembra hematófaga del mosquito Aedes aegypti y Aedes albopictus, los que encontramos ampliamente distribuidos en zonas urbanas y rurales de Asia y el Pacífico (2). El espectro clínico de la enfermedad varía desde un cuadro febril (dengue primario o dengue clásico), hasta las formas graves que pueden manifestarse como fiebre hemorrágica (dengue secundario o fiebre hemorrágica por dengue FHD) o como Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (3).

Los primeros antecedentes históricos que se tienen, parten de los siglos XVIII y XIX cuando se registraron epidemias que probablemente fueron causadas por esta enfermedad (3), a la cual se le ha nombrado de diferentes maneras tales como: Tracazo, Bouquet, Fiebre Quebrantahuesos (3,4,5), Fiebre hemorrágica de Tailandia o de las filipinas (3,6) y no es sino hasta el año de 1869 que el Colegio de Médicos de Londres denominó oficialmente la enfermedad como dengue, palabra de origen hispano-antillano que alude a la marcha especial del paciente, debido principalmente a las mialgias y artralgias que lo afectan (6).

A finales del siglo XIX todavía no se conocía el ágente etiológico, de manera que la única forma de diagnosticar la enfermedad era por las manifestaciones clínicas y la epidemiología, por consiguiente se tenía un amplio margen de error - en los diagnósticos retrospectivos (3). Es hasta 1945 cuando Sabin y Schlesinger (3,7), logran aislar el virus del dengue de pacientes procedentes de Hawai y Nueva Guinea, realizaron experimentos de reacción cruzada mediante los cuales pudieron aislar los serotipos 1 y 2 del virus. Posteriormente durante las epidemias de las Filipinas hacia 1960, se lograron aislar dos nuevos serotipos que antigénicamente estaban relacionados con los tipos 1 y 2, pero claramente diferenciados por pruebas de Fijación de Complemento (FC) y Neutralización (Nt). A estos nuevos serotipos se les denominó 3 y 4 (3,7).- Los cuatro serotipos del virus del dengue pueden ser perfectamente distinguidos e identificados por pruebas de Nt (7).

Después de la II Guerra Mundial, el movimiento migratorio de personas a varios países del mundo trajo como consecuencia - una amplia distribución del virus del dengue, ocurriendo por tanto grandes epidemias de dengue clásico y el establecimiento de zonas donde el FHD y el SCD son endémicos, como es el caso de Asia tropical (8). La distribución y extensión actual de los brotes de dengue incluyen áreas tropicales y subtropicales de varios países del mundo como son: India, Sureste de Asia, Norte de Australia, las islas del Pacífico Occidental, Norte Centro y Sur de América, el Caribe, el Sur de -

Europa, Africa y el Medio Oriente (2).

En el Continente Americano desde 1827 han ocurrido frecuentemente epidemias de dengue, en el Caribe y a lo largo de la Costa del Golfo en los Estados Unidos (3,9).

Se han presentado tres grandes epidemias en el Caribe en los últimos 20 años. La primera epidemia fue en 1963 causada por el serotipo 3, que afectó a Jamaica, Puerto Rico, Antillas Menores y Venezuela. La segunda se presentó en 1969, el serotipo responsable fue el 2 y volvió a recorrer los países antes mencionados llegando a Colombia, donde en 1972 se notificaron alrededor de medio millón de casos (5). En Jamaica, hacia febrero de 1977, se inició la tercera gran epidemia causada por el serotipo I. (siendo éste el primer reporte de dengue I en el Hemisferio Occidental) (10), que afectó a más de 60,000 personas en dicha isla, extendiéndose rápidamente a otros países: Bahamas, Cuba, Puerto Rico - Dominicana, Grenada, Surinam y Venezuela (5,10). En febrero de 1978 esta epidemia se extendió a Honduras, El Salvador, Guatemala y a finales de diciembre del mismo año se notificaron los primeros 38 casos en Tapachula, Chiapas, México (5,11,12). Durante los seis siguientes años, la transmisión de la enfermedad en nuestro país se propagó en 22 Estados (12).

En el sexenio de 1979 a 1984 las unidades médicas del Insti-

tuto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reportaron un total de 153,625 casos de dengue clásico (Cuadro 1) (12). En 1980 se registraron numerosos casos en las zonas áridas de Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila y el Sur de Texas, EUA. Los Estados más afectados en nuestro país hasta el año de 1983 -- fueron: Coahuila (taza de 275.3 por 100,000 habitantes), Guerrero (taza de 7.8), Yucatán (taza de 186.0), Quintana Roo (taza de 173.5), Chiapas (taza de 134.2), Baja California Sur (taza de 131.8), Tamaulipas (taza de 121.7), Veracruz (taza de 118.1), Michoacán (taza de 98.0), Sonora (taza de 93.5), Oaxaca (taza de 77.0) y algunas poblaciones de Sinaloa, todos éstos localizados en la región tropical y subtropical del país. En 1983 el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de San Juan de Puerto Rico, informó de la circulación simultánea en México de los serotipos 1, 2 y 4 del virus (13). En 1984 el Centro de Investigaciones y Diagnóstico de Enfermedades de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), informó que el serotipo 2 circulaba en el Estado de Jalisco, el serotipo 1 en Colima, Jalisco, Morelos y Nayarit y el serotipo 4 en Yucatán donde se comprobaron cuatro casos de enfermedad hemorrágica y síndrome de choque (12). En este mismo año se presentó un brote que se extendió por el Norte de Sinaloa y el Suroeste de Sonora, el Sur de Puebla y la parte adyacente del Estado de Morelos y las Huastecas de Hidalgo, Tamaulipas y San Luis Potosí (12). En 1985 se notificaron 17,706 casos de dengue clásico, en 1986 hubo un total de 44,226 casos de dengue primario -

con 2 reportes de FHD en el Estado de Nuevo León (14), en 1987 fueron 16,209 casos presentándose 4 con FHD en Morelos y 2 en el Distrito Federal (15) (Fig.1).

Cuadro 1. CASOS DE DENGUE POR AÑO Y TASAS IMSS
1979 - 1984.

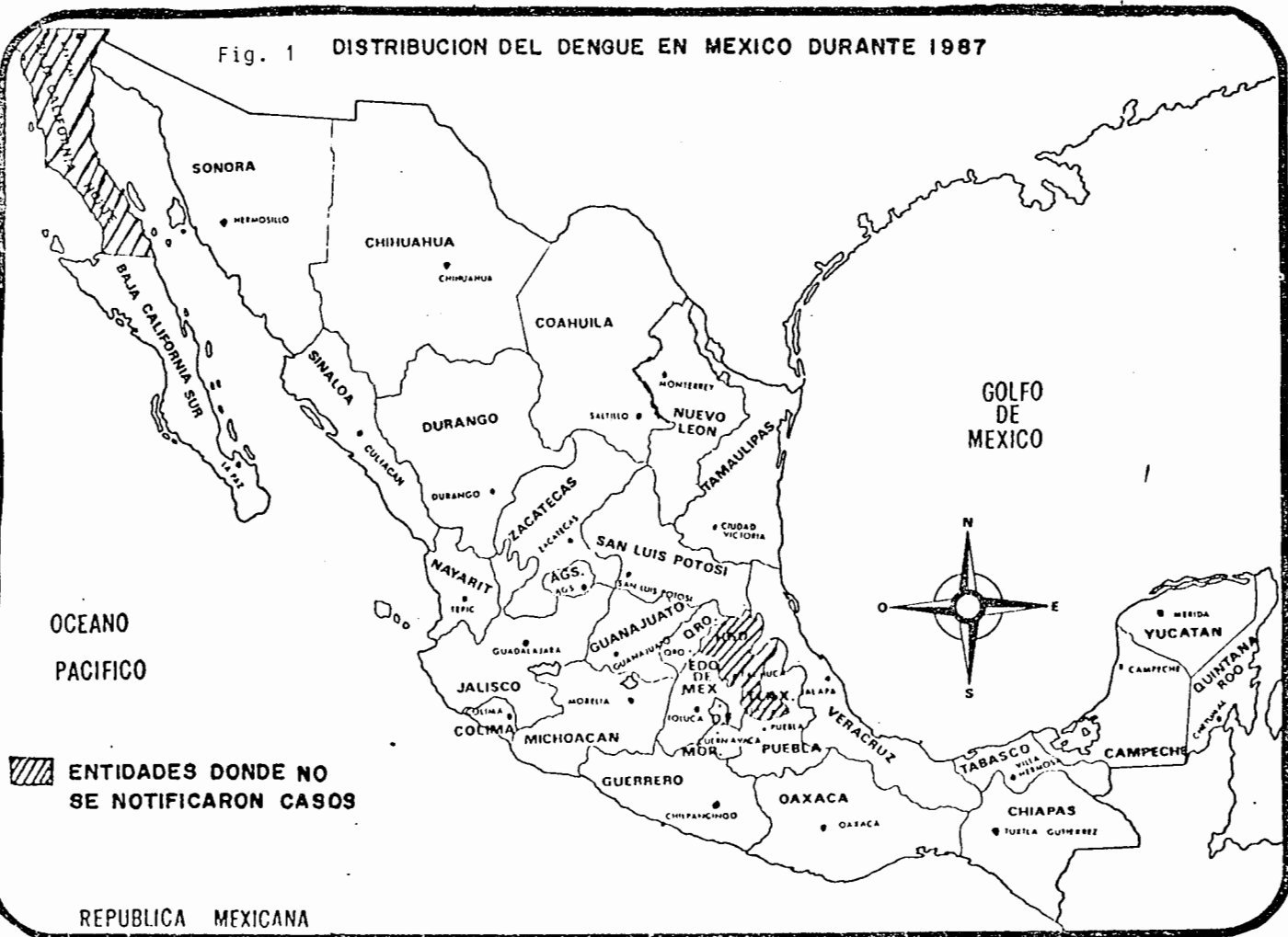
AÑO	CASOS	TASAS ⁺
1979	9 721	48.8
1980	58 780	260.2
1981	18 566	71.6
1982	28 430	103.3
1983	20 686	50.1
1984	17 442	44.9

⁺ Tasa por 100 000 derechohabientes del IMSS.

Los serotipos infectantes no se notificaron en todas las epidemias.

Fuente: Boletines epidemiológicos anuales, Jefatura de Medicina Preventiva del IMSS.

Fig. 1 DISTRIBUCION DEL DENGUE EN MEXICO DURANTE 1987



EPIDEMIOLOGIA

El Vector.

En América el principal transmisor de la enfermedad es el mosquito Aedes aegypti, cuyo hábitat natural está casi limitado a las regiones tropicales y subtropicales del mundo, debido a ésto es que el dengue es endémico en dichas regiones. Encontramos al mosquito en las latitudes 45° Norte y 35° Sur del Ecuador (16), por otro lado tenemos que, en los trópicos mexicanos la población del mosquito adulto y sus larvas guardan una estrecha relación con la precipitación pluvial y la altitud menor de 1,000 m. sobre el nivel del mar (16). Las dos especies de mosquitos transmisores son:

Aedes aegypti.- Es un mosquito de hábitos domésticos principalmente, se reproduce dentro de cualquier recipiente capaz de retener agua (floreros, ollas, frascos, latas, neumáticos, etc.). La hembra o vector se infecta después de picar a un paciente virémico manteniéndose infectante durante el resto de su vida. Esta deposita los huevecillos dentro de recipientes que contienen agua, los huevecillos resisten la sequía en períodos hasta de 6 meses y temperaturas tan bajas como -8° C y si se mantienen húmedos llegan a formar larvas acuáticas en un período de 12-24 hrs. El desarrollo larvario se efectúa entre 5 a 7 días, su metamorfosis continúa al transformarse en pupa o ninfa, proceso que dura de 48-72 hrs. -

tiempo en el cual el insecto no se alimenta, sino hasta que finaliza su transformación y eclosiona liberándose el mosquito adulto o imago. El adulto es muy sensible al frío y muere si queda expuesto a una temperatura de 6°C durante 24 hrs., aunque su resistencia depende del estado nutricional, del grado de humedad y la temperatura del ambiente. Esta especie es de hábitos diurnos y nocturnos y lo encontramos distribuido en América (excepción de Canadá, Alaska y Groenlandia), en Africa y Australia (16) (Fig.2).

Aedes albopictus.- Estos mosquitos son de hábitos diurnos - registrándose su actividad máxima durante la tarde de 3 a 6 p. m., y la mínima por la mañana de 6 a 8 a.m. Su hábitat es - principalmente selvático localizándose en los troncos de los árboles y bambúes, pican al hombre así como a las aves, cerdos, caballos y perros (16).

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en Australia, las Islas Marianas, Hawai, Somalia y Madagascar, recientemente se reportó su presencia en el Continente Americano- (16).

Sexo.

Varios autores han realizado estudios en regiones donde el dengue constituye un problema de salud, y se observó que - las hospitalizaciones por FHD y SCD son más frecuentes en - mujeres que en hombres, probablemente debido a que las mu -

jerés están más expuestas a la picadura del mosquito doméstico (8), aunque se sabe que la incidencia de la enfermedad es independiente del sexo. En México el IMSS realizó un estudio en los años 1980 a 1982 y 1984 en el que se analizó la distribución de casos de dengue por sexo, se reportaron 60,749 casos del sexo masculino (50.3%) y 58,755 (49.77%) del sexo femenino. En 1984 dicha institución realizó otro estudio, en donde se analizó la distribución de casos de -- acuerdo a edad y sexo, con un total de 17,442 casos registrados (Cuadro 2) (12).

Climatología.

Por otro lado, se observa la relación entre la época de lluvia y el aumento en el número de casos de pacientes con dengue, ya que la precipitación pluvial favorece el incremento en la población del vector pues ofrece las condiciones óptimas para que se efectúe el ciclo vital del mosquito (17).

Otros factores importantes que influyen en la epidemiología del dengue.

Se ha observado en fechas recientes que la propagación del mosquito vector se ha incrementado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, debido al crecimiento acelerado de las poblaciones humanas, así como al aumento de los movimientos migratorios poblacionales y del transporte aéreo

y terrestre, y también a la enorme producción de basura, to do ésto aunado a que no ha sido posible erradicar el Aedes aegypti.

Nivel Nutricional.

Scott B. Halstead (8) realizó un estudio, en el que analizó la relación entre el nivel nutricional en niños y la frecuencia de FHD-SCD y observó que las manifestaciones graves de la enfermedad son raras en niños desnutridos. Posteriormente, otros autores (18) afirmaron que las complicaciones del dengue no están asociadas con las condiciones nutricionales ni socioeconómicas de los pacientes.

Edad.

Otras investigaciones hechas por diferentes autores en países donde el dengue es endémico, muestran que la mayor frecuencia de casos por dengue hemorrágico ocurre en niños entre 7 y 8 meses de edad (8), también se ha observado que las hospitalizaciones por SCD disminuyen considerablemente en el grupo de 15 años (8). Por el contrario en los países donde el dengue no es endémico como es el caso de Estados Unidos, el curso de la enfermedad es benigno (dengue clásico) presentándose muy pocos casos con manifestaciones hemorrágicas y los casos que se han reportado son leves, no conduciendo a la muerte (19).

Infecciones Secundarias.

Se ha observado que las infecciones de tipo primario, causa das por alguno de los serotipos del virus del dengue, casi siempre son menos severas que en una infección de tipo secundaria, para explicar ésto Scott B Halstead en 1970 propuso que el SCD involucra un mecanismo inmunopatológico, el cual requiere de la sensibilización del hospedero por anticuerpos, adquiridos pasivamente o por inmunidad heteróloga a los virus del dengue durante un período crítico menor de 5 años, de manera que los anticuerpos producidos en una segunda infección y la formación de complejos inmunes, probablemente favorecen la internalización del virus en las células del sistema retículo endotelial, de esta forma la concentración de complejos inmunes trae como consecuencia un aumento en la permeabilidad vascular y la activación de factores de coagulación presentándose así las manifestaciones clínicas severas del FHD-SCD (3,8,20). Sin embargo también se ha señalado la ocurrencia de casos graves con una respuesta inmune de tipo primario (8).

Secuencias de Infección.

El mismo autor realizó un estudio en el que analizó casos de personas con infecciones primarias y secundarias con SCD de éstos últimos aisló con mayor frecuencia el serotipo 2 del virus y observó que en las secuencias de infección donde el serotipo 2 sigue a uno de los otros serotipos, la in-

fección por lo regular es más severa que las adquiridas por otras secuencias(8,21,22).

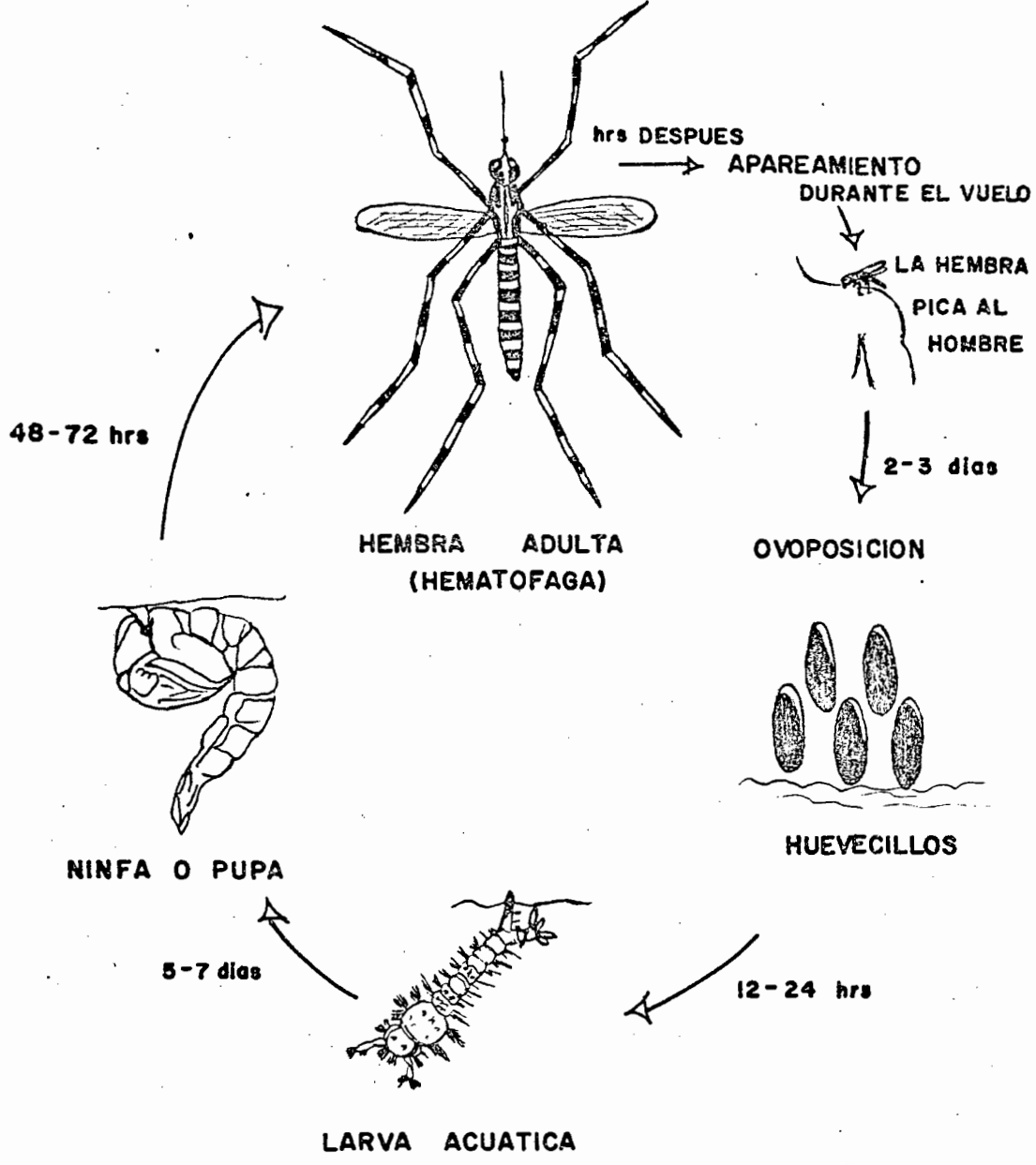


Fig. 2. Ciclo biológico del Aedes aegypti

Cuadro 2. CASOS DE DENGUE SEGUN EDAD Y SEXO IMSS

1 9 8 4

EDAD (años)	CASOS NOTIFICADOS ⁺	COEFICIENTE ⁺⁺
0 - 4	616	9.84
5 -14	2 849	25.3
15 -44	10 650	66.3
45 -65	2 824	74.9
65 y más	503	34.0
MASCULINO	8 712	45.7
FEMENINO	8 730	44.0
T O T A L	17 442	44.8

+ En 541 en los que no se informó la edad se hizo una distribución proporcional.

++ Tasa por 100,000 derechohabientes, calculados sobre una población de 38'872,658 (28'079,883 derechohabientes y - - - 10'792,775 solidariorhabientes de COPLAMAR).

Fuente: Oficina de Estadística, Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva, IMSS.

EL VIRUS

El virus del dengue es de forma esférica, de 36-44 nm de diámetro, su genoma está formado por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva, con un coeficiente de sedimentación de 45 S y peso molecular de 4.2×10^6 daltones, el centro del virus es una estructura esférica de 27 nm de diámetro, la replicación y transcripción se lleva a cabo en citoplasma (asociado a membranas) de las células infectadas, el ensamblaje y la liberación de los viriones no ha sido aclarada pero podría ser por vía del aparato secretor celular (23). El virus tiene tres proteínas estructurales (Fig.3) (23):

La proteína no glicosilada de la nucleocápside "V 2" también llamada "C" (Centro), con un pm de 14 mil y que envuelve al ARN del virus, está rodeada de una bicapa de lípidos e interacciona con la proteína "V 3" o "E" (Envoltura), tiene un pm de ≈ 51 a 60 mil, es una glicoproteína que comprende los peplómeros (espículas) y es en la que residen los epítopos de la hemaglutinación, neutralización y los de tipo específico, y por último la proteína "V I" ó "M" (Membrana), tiene pm de 8 mil, probablemente es una proteína integral de membrana, su localización no es clara en el virión.(23)

El número y función de las proteínas no estructurales no está bien determinado y existen diferencias según el sistema-

de células donde se lleve a cabo la infección (células de - mamíferos y artrópodos). Sin embargo, generalmente se pueden encontrar de doce a quince proteínas específicas del -- virus en cultivos infectados (23).

Entre las propiedades biológicas más importantes de los virus del dengue destaca su capacidad de replicarse en mosquitos, monos y humanos; experimentalmente se han replicado -- además en embriones de pollo y ratón, así como en cultivos celulares primarios y en líneas celulares establecidas - - (VERO, Hela, C6/36, TRA-284, etc.) (24,25). Además tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de ciertas aves (gansos, pollos y patos) y tiene como característica especial el ser pH dependiente (26,27).

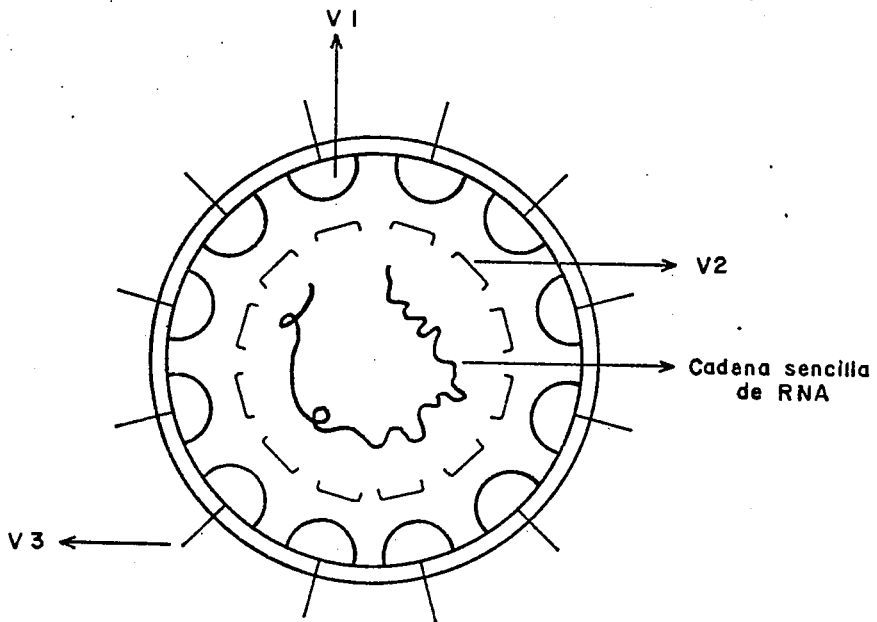


Fig. 3. Modelo tentativo de la organización de un Flavivirus. Los peplómeros consisten de la glicoproteína V3. Una segunda proteína de envoltura no glicosilada, V1 parece estar situada en la bicapa lipídica. La proteína de capsida V2 con el ARN genómico forma la nucleocápsida con simetría cúbica.

CUADRO CLINICO

1.- Dengue Primario o Dengue Clásico. Después de un período de incubación de 2 a 7 días la enfermedad en la mayoría de los pacientes tiene un inicio brusco con fiebre intermitente bifásica de 39°C a 40°C, que persiste de 3 a 6 días y que al remitir aparece erupción, la fiebre es acompañada de dolor retroorbital, cefaleas, mialgias y artralgias intensas, además de escalofríos, algunos pacientes presentan anorexia, alteración del sentido del gusto, tos, ligera inflamación en la garganta, náuseas/vómitos y diarrea moderada o constipación. La exploración física puede revelar hepatomegalia moderada, bradicardia relativa y adenopatía cervical (2,3,-8,25). Los datos de laboratorio son normales excepto leucopenia moderada (2,3,8) (Fig.4).

La sintomatología es benigna en lactantes y preescolares pudiendo pasar desapercibida algunas veces, en cambio en los adultos en la mitad de los casos, puede haber una fase prodrómica con síntomas gripales sin fiebre. Durante la convalescencia, los adultos cursan frecuentemente con un estado depresivo, el cual no se ha registrado en niños (25).

2.- Dengue secundario o Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) con Síndrome de Choque por Dengue(SCD). Afecta principalmente a niños menores de 15 años (2,8). El inicio de la enfermedad es como en la forma clásica con fiebre muy elevada --

con duración de 2-7 días, el estado general se agrava al remitir la fiebre entrando en letargo, la perfusión tisular - periférica se vuelve deficiente, tienen taquicardia y después hipotensión presentando las siguientes manifestaciones hemorrágicas: petequias, púrpura, equimosis, epistaxis, gingivorragias, hematemesis o melena. En la mayoría de los casos se observa hepatomegalia y prueba de torniquete positiva. - Los exámenes de laboratorio informan de leucocitosis moderada, hipoproteïnemia, hipoalbuminemia, hematuria, trombocitopenia, disminución de fibrinógeno y de la mayoría de los componentes del Complemento, hemoconcentración por aumento de la permeabilidad capilar, hematócrito elevado por lo menos 20%. En los casos más graves de FHD se presenta pulso débil, rápido y presión diferencial menor de 20 mm Hg, con disminución de la frecuencia cardíaca conduciendo al paciente a un estado de choque e incluso a la muerte. Las formas graves de la enfermedad presentan una letalidad de 10-40% - (3,8) (Fig.5).

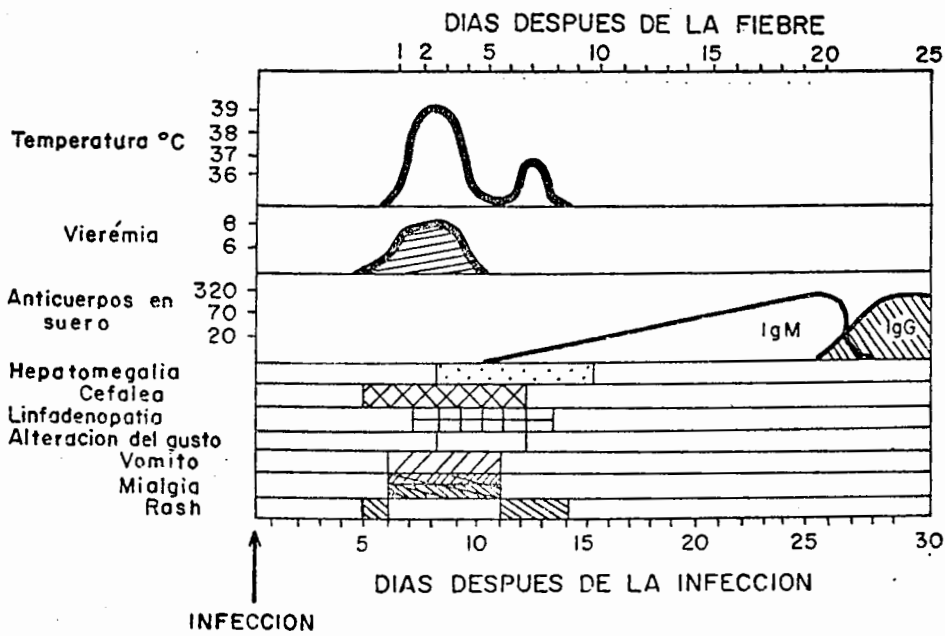


Fig. 4. Evolución clínica del dengue clásico o dengue primario.

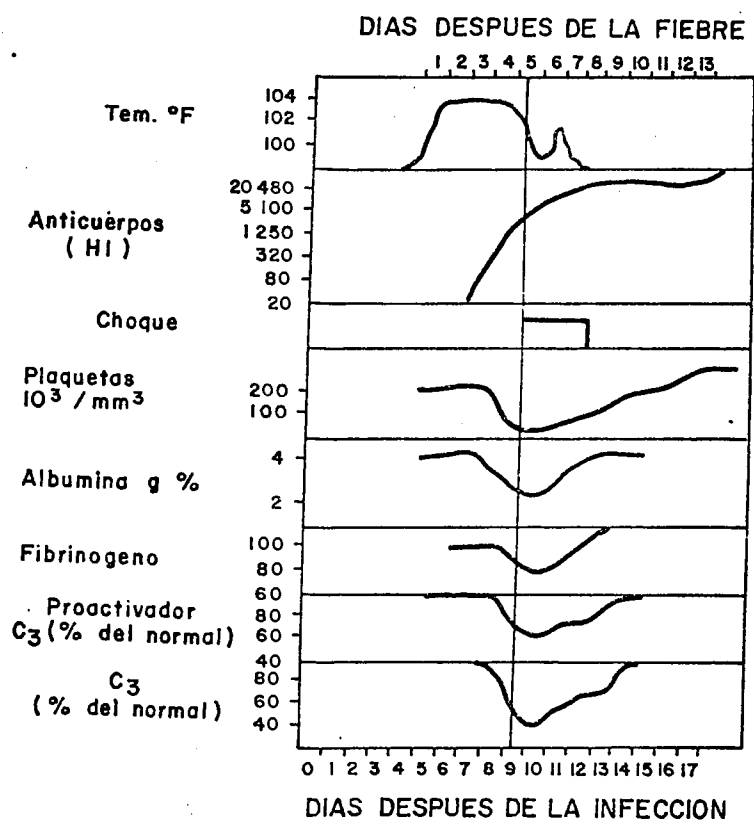


Fig. 5. Esquema que indica los datos clínicos y de laboratorio típicos de casos representativos de SCD.

DIAGNOSTICO

Se han desarrollado varios métodos de diagnóstico, mediante los cuales es posible cuantificar los anticuerpos antidengue a partir de sueros de pacientes, las primeras técnicas utilizadas fueron las de Fijación de Complemento, Inhibición de la Hemaglutinación (IH) y la prueba de Neutralización viral, (26,28). Otra técnica recientemente empleada para la detección de anticuerpos antidengue es el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), mediante esta técnica se detecta la Inmunoglobulina M humana antidengue (29).

Por otro lado existen otras técnicas empleadas para aislar e identificar a los diferentes serotipos del virus del dengue y son la Técnica de Inmunofluorescencia Directa e Inmunofluorescencia Indirecta, las cuales se realizan mediante la inoculación del mosquito Toxorhynchites amboinensis por vía intratorácica (30), o por medio de la replicación viral en cultivos de células de mamíferos (células de riñón de mono LLC-MK2, BHK, VERO) y células de mosquitos (TRA-284; - - C6/36) (31,32).

OBJETIVO GENERAL

- 1.0 Determinar la prevalencia de anticuerpos contra el virus del dengue e identificar los serotipos circulantes en el Estado de Morelos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Aplicar la metodología científica.
- 1.2 Determinar la población en riesgo de padecer la enfermedad.
- 1.3 Producir antígeno viral.
- 1.4 Montaje y estandarización de las técnicas de laboratorio a utilizar.
- 1.5 Aislar e identificar el serotipo del virus.

MATERIAL Y METODOS

A.- Características de la zona estudiada.- El Estado de Morelos se ubica en la parte meridional del altiplano central de la República Mexicana, entre los $18^{\circ}22'30''$ y $19^{\circ}07'10''$ de latitud Norte y los $98^{\circ}37'$ y $99^{\circ}30''$ de longitud Oeste de Greenwich, limita al Norte con el Distrito Federal y el Estado de México; al Este y Sureste con Puebla; al Sur y Suroeste con Guerrero y al Oeste con el Estado de México nuevamente. La situación tropical del Estado es un factor que determina los diversos tipos de climas en la entidad, podemos encontrar desde bajas temperaturas hasta un clima húmedo y semicálido. Presenta una temperatura media anual de 24°C . En la entidad se alojan dos subcuencas hidrográficas: la del Amacuzac que se extiende por casi todo el Estado y la del Nexapa, así como seis lagunas importantes y 50 manantiales. La vegetación ha sido dividida en tres clases: de montaña, subtropical y de enclaves tropicales. Su economía se basa en la actividad agrícola, ganadera, avícola, apícola, frutícola, forestal, industrial, manufacturera y comercial, lo que implica grandes movimientos poblacionales en forma tanto permanente como temporal (33) (Fig.6).

También en este Estado se han presentado brotes de dengue, notificándose en 1983 320 casos, en 1984 un mínimo de 26 casos (34), en 1985 fueron 1,159 casos, en 1986 -

se reportaron 267 casos (14) y en 1987 un total de 653 casos de los cuales 4 con FHD (15).

B.- Obtención de los Sueros.- Las muestras de sangre fueron obtenidas de 94 pacientes que acudieron a cinco clínicas rurales del Estado de Morelos por presentar fiebre y cuadro sugestivo de dengue. Se contó con la colaboración del personal médico y paramédico de la Secretaría de Salud y Bienestar Social del Estado de Morelos:

- 1- Se extrajo 5 ml de sangre en condiciones estériles, sin anticoagulante y se usaron jeringas y agujas desechables evitando al máximo su hemólisis.
- 2- La sangre se colocó en un tubo de ensaye estéril previamente etiquetado con el número de serie, nombre del paciente, lugar de colecta y fecha.
- 3- Se colocaron tubos con la sangre en hielo o en un refrigerador tan pronto como fue posible y se dejó coagular.
- 4- Se centrifugaron los tubos a 1,500 rpm durante 10 minutos.
- 5- Se transfirió el suero a un tubo limpio, estéril y debidamente etiquetado.
- 6- Se colocaron los tubos en una gradilla y se almacenaron en congelación a -70°C . Los sueros fueron transportados cada fin de semana al Centro de Parasitología Animal, localizado en Cuernavaca, Morelos.

7- En el momento de la toma de la muestra se llenaron dos cuestionarios en los que se solicitaron datos -- del paciente (Anexo 1), dejando uno en el archivo -- donde se tomó la muestra y se envió el otro junto -- con el suero para su análisis en el laboratorio de -- Virología del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

C.- Tratamiento de los Sueros.

Con el objeto de eliminar los inhibidores y las aglutininas inespecíficas, los sueros se trataron con una suspensión de Kaolín al 25% y se adsorbieron con eritrocitos de ganso al 50% mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- Se agregó a cada tubo de 13 x 100 mm 1 volumen (50 μ l)- de suero, 4 volúmenes (200 μ l) de BS pH 9.0 y 5 volúmenes (250 μ l) de Kaolín.
- 2.- Se mezclaron vigorosamente y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min. agitándose cada 5 a 10 min. y centrifugándolos posteriormente a 2,500 rpm por 30 -- min. en frío.
- 3.- A los sobrenadantes se les agregó 0.1 ml de eritrocitos de ganso al 50% manteniéndolos en hielo con agitación -- ocasional durante 20 min. Finalmente se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min. en frío.
- 4.- El sobrenadante representa una dilución 1:10 del suero-

original que se empleó posteriormente en la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

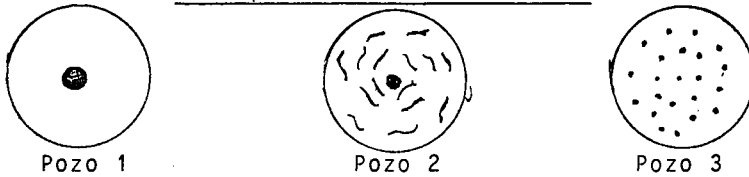
D.-Determinación de Anticuerpos Inhibidores de la Hemaglutinación.

- 1.- A partir de la dilución 1:10 del suero (muestra tratada), se realizaron diluciones seriadas al doble, en buffer - BABS pH 9.0, se agregó un volumen de 25 μ l de la dilución de cada suero al primer pozo de cada hilera (de la A a la H) de las placas.
- 2.- Se agregaron 25 μ l de antígeno (volumen al cual se tienen de 4 a 8 UHA) en cada uno de los pozos de las placas colocándolas posteriormente en un vibrador y se incubaron a 4°C de 12 a 18 hrs.
- 3.- Posteriormente se colocaron las placas a temperatura -- ambiente y se les agregó a todos los pozos 50 μ l de una suspensión de eritrocitos de ganso al 8% en DGV, diluidos 1:24 en buffer con pH adecuado dejándolas nuevamente a temperatura ambiente durante 45 a 60 min. para observar los resultados (Fig.7). Se confirmó la cantidad de UHA por medio de una retrotitulación del antígeno -- utilizado.
- 4.- En cada prueba se incluyó un control de eritrocitos.
- 5.- Se consideró positiva una muestra de suero al presentar

un título mayor o igual a 1:20 de acuerdo al criterio del CDC (35).

Figura 7

Interpretación de resultados



Pozo 1.- No Hemaglutinación o Inhibición de la Hemaglutinación por anticuerpos homólogos: como se observa en el pozo 1, los eritrocitos se sedimentan en el fondo del pozo, formando un botón.

Pozo 2.- Hemaglutinación parcial: como en el pozo 2 se observa la formación de un anillo de eritrocitos aglutinados, alrededor de un botón de células.

Pozo 3.- Hemaglutinación completa: en el pozo 3 se observa una capa o malla uniforme de eritrocitos (ausencia de botón).

E.- Preparación del Antígeno.

1.- Ratones lactantes de 24-48 hrs. de edad de la cepa -- Balb/c fueron inoculados por vía intracerebral, con 25-30 μ l de una suspensión de cerebro de ratón al 20% en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 con suero fetal bovino (SFB) al 30% y diluido 1:100 en PBS - Albúmina 1% de

cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue, - los cuales fueron proporcionados amablemente por el Dr. Duane J. Gubler Jefe de los Laboratorios San Juan del - Centro para el Control de Enfermedades (CDC), en San - Juan Puerto Rico.

- 2.- Los ratones inoculados se mantuvieron en observación en tre 6 y 12 días, hasta la aparición de los signos de la enfermedad (parálisis u otros signos referentes al desa rrollo patológico del Sistema Nervioso Central) poste - riormente los ratones moribundos se sacrificaron y se - mantuvieron en congelación a -70°C hasta que se realizó la extracción del cerebro.
- 3.- Después de descongelar los ratones infectados se limpiaron con etanol al 70% y se les extrajo el cerebro, - con una jeringa de 20 ml y aguja del No.18 y se calculó el peso de los mismos. Se homogenizaron con 4 volúmenes de una solución sacarosa al 8.5% (P/V), durante 3 ciclos de un minuto cada uno.
- 4.- Por cada volumen del homogenado se añadieron 20 volúmenes de acetona fría, en una proporción de 9 ml del homo genado en 180 ml de acetona y se conservaron en un baño de hielo durante una hora.
- 5.- El homogenado se centrifugó a 1,500 rpm a 4°C durante - 5 min. El sobrenadante se descartó en un recipiente con hipoclorito y se añadieron nuevamente 180 ml de acetona fría. Se pulverizó el sedimento con un émbolo de teflón y se conservó el frasco en refrigeración durante 2 hrs.

- 6.- Se centrifugó a 1,500 rpm a 4^oC durante 5 min. El sobrenadante se descartó dentro de un recipiente con hipoclorito.
- 7.- El sedimento se secó al vacío, aproximadamente durante 1 hora.
- 8.- Posteriormente, el antígeno se resuspendió en Borato Salino (BS) estéril con pH 9.0 en un volumen igual al de 0.4 del volumen original, y se dejó hidratando a 4^oC durante toda la noche.
- 9.- Se centrifugó a 10,000 rpm a 4^oC durante 60 min. y se añadió al sobrenadante obtenido TRIS 1.0 M, para obtener una concentración final de 0.1 M de TRIS. Después se hicieron alícuotas de 0.5 ml y se almacenaron a -70^oC.

F.- Titulación del Antígeno por la técnica de la Hemaglutinación.

- 1.- Se hizo una dilución 1:10 del antígeno en Borato Salino Albumina Bovina (BABS) al 0.4% estéril a pH 9.0.
- 2.- Se realizaron diluciones seriadas dobles del antígeno (vol. de 50 μ l), en una placa de microtitulación de 96 pozos, de fondo en U.
- 3.- Se añadieron 50 μ l de una suspensión de eritrocitos de ganso al 8% en Dextrosa-Gelatina-Veronal (DGV), diluidos 1:24 en el buffer con pH adecuado. En caso de no saber cuál es el óptimo pH al que aglutinan los eritrocitos,-

entonces es necesario hacer una curva de titulación a diferentes pHs (5.8-7.0) (Fig.8).

- 4.- Se incubó la placa o placas a temperatura ambiente durante 30-45 min. para observar posteriormente la hemaglutinación.
- 5.- El título del antígeno (hemaglutinina viral), es la dilución más alta capaz de aglutinar a todos los glóbulos rojos, ésto es igual a 1 Unidad Hemaglutinante (UHA).

G.- Cultivo Celular.

Las células utilizadas para el aislamiento y determinación del virus del dengue provienen del mosquito Toxorhynchites amboinensis (TRA-284) proporcionados por el Dr. Goro Kuno, de los laboratorios San Juan, en San Juan Puerto Rico.

- 1.- Las células se cultivaron en frascos de 25, 75 ó 150 cm² de sup., con un medio preparado con Triptosa fosfato, - medio de Leibovitz (L-15) en una proporción 1:1 y Suero fetal bovino al 1%.
- 2.- Se incubaron las células en los frascos durante 3 días a 28°C, hasta lograr un 80-100% de confluencia y posteriormente se prepararon tubos de cultivo con 2-3 ml de suspensión celular.

H.- Aislamiento Viral mediante Inmunofluorescencia Directa.

- 1.- En los tubos con monocapa confluyente se eliminó 1 ml. -

de medio, para inocular después con 50 μ l de suero humano previamente filtrado y posteriormente se incubaron a 28^oC durante 1 hora.

- 2.- Después se le agregó a cada tubo 1 ml de medio fresco.
- 3.- Se incubaron los tubos a 28^oC durante 10 días, hasta que se observó el Efecto Citopático (ECP).
- 4.- Se desprendieron las células de la superficie del tubo mediante agitación y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min.
- 5.- El sobrenadante se descartó casi por completo y el resto se empleó para resuspender las células.
- 6.- Del resuspendido se hizo goteo en laminillas de teflón con 12 horadaciones (a razón de una laminilla por espécimen), el resuspendido restante se almacenó a 4^oC para utilizarlo posteriormente (en los casos positivos) para identificar el virus.
- 7.- Posteriormente se secaron las laminillas durante 30 min. en la campana de flujo laminar y se fijaron en acetona-fría durante 10 min.
- 8.- Se agregó una gota en cada horadación de la laminilla del antisuero humano antidengue policlonal conjugado -- con Isotiocianato de Fluoresceína y se incubó en cámara húmeda a 37^oC durante 30 min.
- 9.- Las laminillas se lavaron en PBS pH 7.5 a temperatura ambiente y agitación constante durante 10 min.
- 10.- Se montó un cubreobjetos con glicerol (glicerol 70% - - PBS 30%), sobre la laminilla para observar al microscopio.

pio de fluorescencia.

- 11- Se incluyó un control positivo (con células infectadas con una cepa prototipo del virus del dengue) y un control negativo (células sin infectar).

I.- Identificación del Serotipo mediante Inmunofluorescencia Indirecta.

- 1.- Con el resuspendido de células de los casos positivos por inmunofluorescencia directa, se gotearon laminillas de teflón con 12 horadaciones a razón de una laminilla por muestra, se secaron y fijaron como en el inciso 7-H. Se incluyeron 5 controles: uno negativo y cuatro positivos (células infectadas con cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue).

- 2.- Se lavaron dos veces en PBS pH 7.5 en dos recipientes diferentes, sumergiéndolos 10 veces en cada lavado.

- 3.- Se secó alrededor de cada pozo con un hisopo y se delineó alrededor de cada uno de ellos con un lápiz graso.

- 4.- Se agregó una gota de anticuerpo monoclonal contra cada uno de los cuatro serotipos (obtenido en ratón y diluído 1:100 en PBS pH 7.5) a cada dos pozos de la laminilla por monoclonal.

Se incluyeron también los controles.

- 5.- Se incubaron en cámara húmeda a 30°C por 30 min.

- 6.- Posteriormente, se transfirieron a un recipiente con PBS pH 7.5 y se lavaron en 3 períodos de 10 min. cada uno, con agitación constante.

- 7.- Se secaron las laminillas con un hisopo.
- 8.- Se añadió una gota a cada pozo del suero anti-IgG de ra tón fluoresceinado obtenido en cabra, incluyendo los - controles.
- 9.- Se incubaron en cámara húmeda a 35^oC durante 30 min.
- 10- Se lavaron como en el inciso 9-H.
- 11- Las laminillas se secaron y montaron con un cubreobje - tos con glicerina (glicerina 90% PBS 10%) y fueron ob - servadas al microscopio de fluorescencia.

Interpretación de Resultados.

- a). Positivo. Fluorescencia citoplasmática perinuclear y en membrana celular.
- b) Negativo. Ausencia de fluorescencia celular especí - fica.

▲ Serotipo 2
▨ Serotipo 3

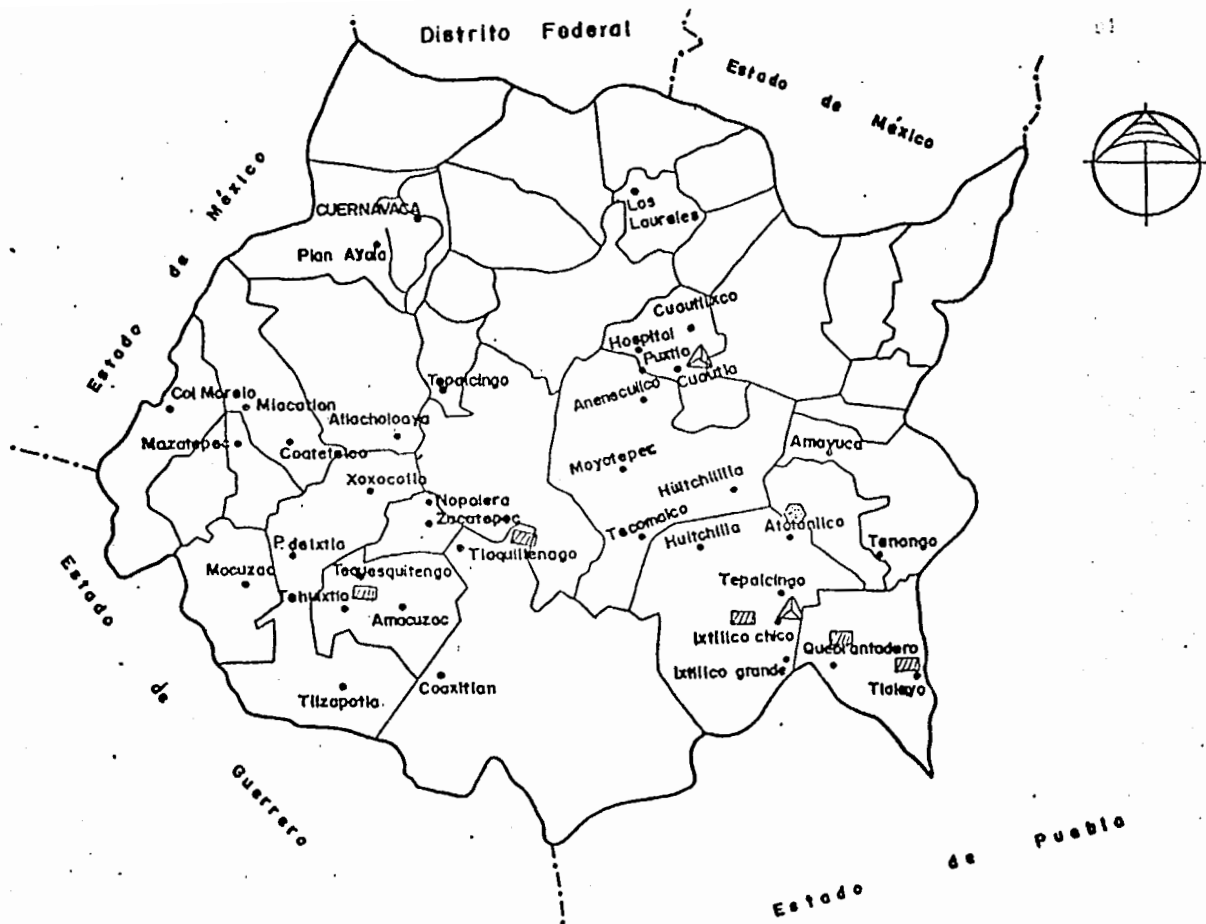


Fig.6. Mapa del Estado de Morelos con la ubicación de las poblaciones incluidas en este trabajo.

CPALCO

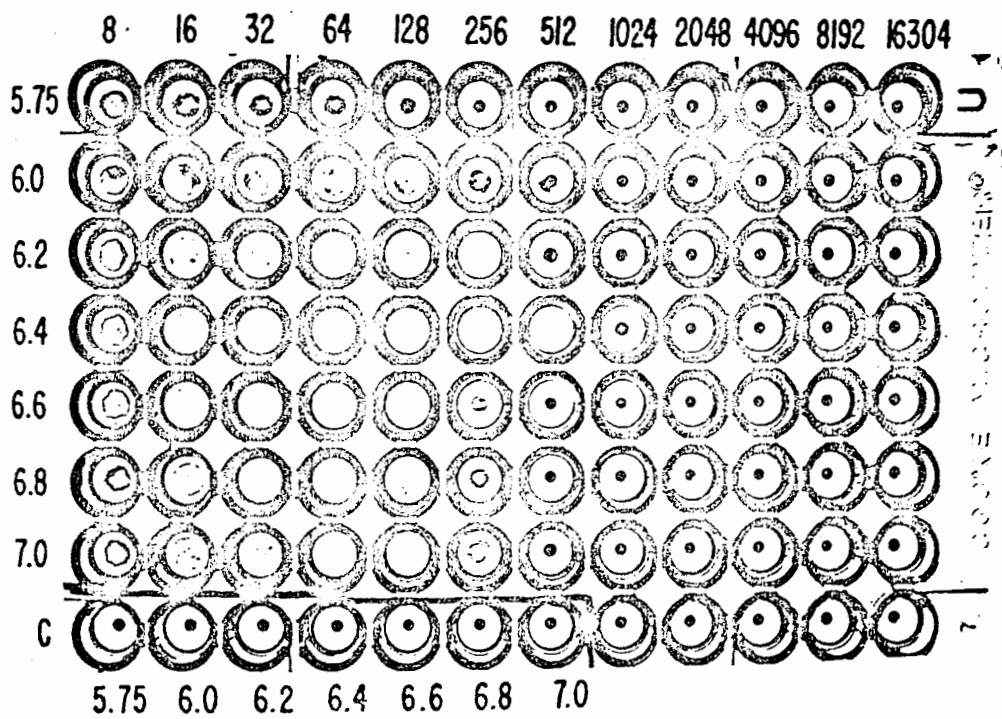


Fig. 8. Curva de titulación de la hemaglutinina viral a diferentes pHs.

RESULTADOS

Se procesaron 94 sueros de pacientes en fase aguda provenientes de 27 localidades del Estado de Morelos, de los cuales su distribución por edad y sexo se encuentra en el Cuadro 3.

A partir de los datos obtenidos en el Anexo 1, encontramos que las principales manifestaciones clínicas referidas por los pacientes fueron: fiebre, mialgias, artralgias, dolor retroocular, y algunas manifestaciones hemorrágicas (Cuadro 4).

Se consideró que una muestra de suero, tenía anticuerpos -- contra el virus del dengue, al presentar un título de - - $IH \geq 1:20$ contra uno o más de los serotipos del virus. No se observó una diferencia clara entre ambos sexos, aunque - sí un ligero predominio del sexo femenino (Cuadro 5).

En cuanto a la frecuencia de seropositividad por IH contra alguno de los serotipos del virus de acuerdo a la edad se - encontró que el grupo que presentó mayor porcentaje (40.5%) fue el de 16-30 años (Figura 9).

De los sueros analizados se observó que el 42.3%, 17.7% y - 49.0% presentaron títulos positivos ($\geq 1:20$) contra los se rotipos 1, 2 y 3 respectivamente. Mientras que del 89.0% de sueros positivos contra el serotipo 4, el 73.2% presentaron

títulos entre 1:20 - 1:320 y el 15.8% tuvieron títulos IH - positivos entre 1:640 y $\geq 1:1280$ (Fig.10).

Mediante la inoculación de cultivos celulares (TRA-284), con las muestras de sueros, se logró aislar el virus del dengue en 11 casos (11.7%), de éstos el 63.6% (7 casos) correspondieron al serotipo 4, en tanto que de dos casos (18.1%) se aisló el serotipo 2 y el serotipo 1 también se aisló de -- otros dos casos (18.1%). Algunos de los serotipos del virus fueron aislados de la misma localidad, como es el caso de - Tehuixtla de donde se identificó el serotipo 4 a partir de dos muestras. En el Cuadro 6 se encuentran resumidos los da tos completos de los once casos en los que se pudo aislar - e identificar alguno de los serotipos del virus del dengue.

Cuadro 3. DISTRIBUCION DE CASOS SEGUN EDAD Y SEXO

EDAD (años)	SEXO					
	FEMENINO		MASCULINO		T O T A L	
	No.	%	No.	%	No.	%
< 15	9	18.3	9	20	18	19.1
16 - 30	21	42.8	22	48.8	43	45.7
31 - 45	14	28.5	7	15.5	21	22.3
46 - 60	4	8.1	4	8.8	8	8.5
61 - 75	1	2.0	3	6.6	4	4.2
TOTAL	49	52.1	45	47.8	94	100

Cuadro 4. MANIFESTACIONES CLINICAS REFERIDAS POR 94 PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

SIGNOS Y/O SINTOMAS	PACIENTES	
	No.	%
FIEBRE	94	100
CEFALEA	94	100
MIALGIAS	92	97.8
ARTRALGIAS	91	96.8
DOLOR RETROOCULAR	85	90.4
*MANIFESTACIONES HEMORRAGICAS	12	12.7

* Petequias, equimosis, púrpura, epistaxis, gingivorragia, hematemesis, melena, hematuria.

Cuadro 5. FRECUENCIA DE SEROPOSITIVIDAD DE ACUERDO AL SEXO EN LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS.

SEXO	POSITIVOS*	
	No.	%
FEMENINO	46	47.8
MASCULINO	41	43.6
T O T A L	87	91.4

* De las 94 muestras analizadas 7 de ellas no presentaron anticuerpos IH contra los serotipos del virus.

SEROPOSITIVIDAD SEGUN GRUPOS DE EDAD

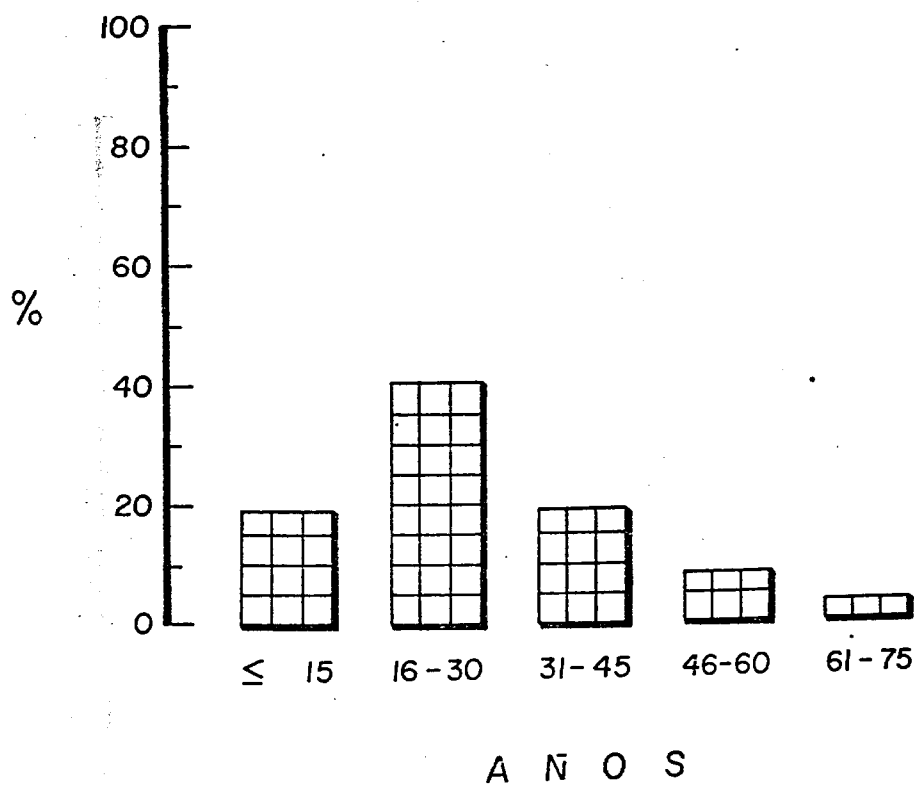


Fig. 9. Frecuencia de seropositividad según grupos de edad.

SEROPOSITIVIDAD POR TITULOS DE ANTICUERPOS IH Y SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE

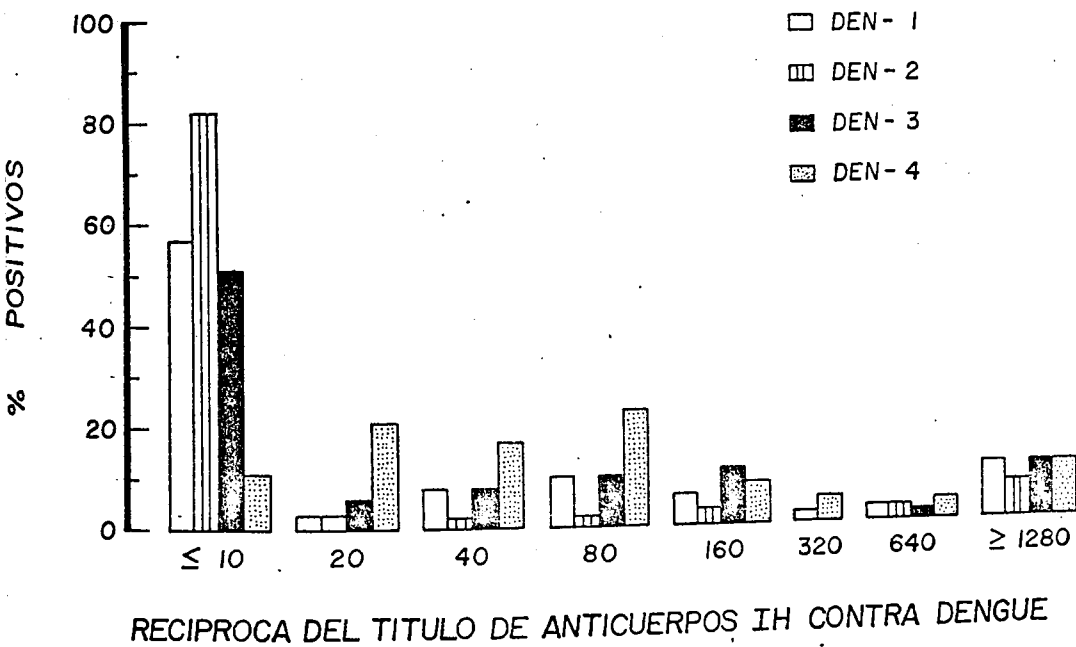


Fig.10. Frecuencia de seropositividad por título de anticuerpos IH y serotipo del virus en los sueros estudiados.

Cuadro 6. DISTRIBUCION DE CASOS POSITIVOS POR AISLAMIENTO SEGUN EDAD, SEXO, LOCALIDAD, TITULO DE ANTICUERPOS POR IH Y SEROTIPO.

Código PACIENTE	LOCALIDAD	EDAD (años)	SEXO	TITULO DE ANTICUER- POS POR IH CONTRA				SEROTIPO
				D-1	D-2	D-3	D-4	
57	Tehuixtla	17	F	160	10	80	80	Dengue - 4
59	Tehuixtla	19	F	320	< 10	80	320	Dengue - 4
60	Tlaquiltlenango	57	M	< 10	< 10	20	20	Dengue - 4
61	Tlalayo	59	M	< 10	< 10	< 10	40	Dengue - 4
64	Tlalayo	19	M	80	< 10	< 10	80	Dengue - 4
70	Atotonilco	42	F	< 10	< 10	10	80	Dengue - 1
72	Quebrantadero	42	M	10	< 10	80	80	Dengue - 4
75	Atotonilco	28	M	< 10	< 10	20	80	Dengue - 1
79	Ixtlilco chico	18	M	< 10	< 10	< 10	80	Dengue - 4
86	Cuautla	32	F	< 10	< 10	< 10	< 10	Dengue - 2
88	Ixtlico chico	19	F	80	10	160	80	Dengue - 2

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este estudio fue posible realizar la identificación de los serotipos 1,2 y 4 del virus del dengue en 11 casos (11.7%) (Cuadro 6).., la frecuencia de aislamiento fue baja al compararla con aquellas (45.2%) y (21.8%) obtenidas en los brotes estudiados por los laboratorios del CDC (36,37), en donde se utilizaron las mismas técnicas de aislamiento (Inmunofluorescencia directa e indirecta) (24), que empleamos en este trabajo. La baja frecuencia de aislamiento probablemente se deba al manejo inadecuado de las muestras, ya sea en la transportación o en el almacenamiento previo a su recepción en el laboratorio de virología, ya que el CDC (35) indica que de no seguirse los lineamientos del mantenimiento de las muestras disminuye en forma importante las posibilidades de aislamiento.

El serotipo 4 se aisló en mayor proporción (63.6% contra el 18.1% para cada uno de los serotipos 1 y 2), y la mayoría de los casos con aislamiento positivo presentaron títulos de anticuerpos IH más elevados contra el serotipo 4 (Cuadro 6). Ninguno de los casos en los que se aisló alguno de los serotipos presentaron manifestaciones hemorrágicas.

Al finalizar el presente trabajo pudo observarse que tanto los hombres como las mujeres se han visto afectadas por el dengue (Cuadro 3) y al igual que en el estudio realizado --

por M. Figueroa y col. (5), se encontró un ligero predominio del sexo femenino para contraer la enfermedad, lo cual pueda deberse a que las mujeres permanecen más tiempo en sus domicilios y están más expuestas al mosquito doméstico.

El 89.0% de los pacientes presentaron títulos de anticuerpos IH contra el serotipo 4, mientras que se observó en una mayor proporción (42.3%, 17.7% y 49.0%) pacientes con títulos IH positivos para los serotipos 1,2 y 3 respectivamente (Fig. 10).

Debido a que el serotipo 4 fue el más frecuentemente aislado y que un 89.0% de los pacientes presentaron respuesta serológica contra este serotipo, nos sugiere que, a pesar de haberse aislado los serotipos 1 y 2, el virus del dengue 4 es el que circulaba predominantemente en la región, además de que es la primera vez que se reporta la circulación del mismo en el Estado de Morelos.

No fue posible establecer el tipo de infección que presentaron los pacientes (primaria o secundaria), puesto que según los criterios del CDC (35) deben tomarse dos muestras de sangre y nosotros sólo contamos con una sola muestra en la fase aguda de la enfermedad.

Al analizar los resultados de seropositividad de acuerdo a la edad (Fig. 9) encontramos que el grupo más afectado fue-

el de 16-30 años lo que difiere con los reportes de Carrada B. y col. (12), del CDC (36,37), Figueroa y col. (5) y Guiscafré G. y col. (38), quienes han reportado que la frecuencia de seropositividad aumenta en forma progresiva con la edad (encontrándose el pico máximo aproximadamente a los 60 años de edad), esta diferencia consideramos que se deba a que la muestra no es homogénea puesto que el mayor número de casos se encuentra en ese grupo de edad (Cuadro 3).

La mayoría de los pacientes presentaron las manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad (Cuadro 4) lo cual aunado al porcentaje de seropositividad por IH y a los aislamientos obtenidos, puede considerarse que la mayoría de los pacientes se encontraban enfermos de dengue.

La mayoría de las localidades en donde hubo aislamiento se ubican en la zona Suroeste y algunas en el Sureste del Estado, estas regiones son las más bajas y húmedas de la entidad (Fig. 6).

A pesar de que la muestra analizada no es representativa del Estado de Morelos, es posible darse cuenta de que el dengue se encuentra ampliamente distribuido en dicha entidad, influyendo en la propagación del virus hacia otros Estados de la República Mexicana por lo que es importante contar con programas permanentes de vigilancia epidemiológica de la enfermedad y del mosquito.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Kerchner J.H.; Vorndan A.V.; Monath, Thomas P. y Trent, Dennis W.: Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic -- deoxyoligonucleotides as probe: J.Gen.Virol. 67:2645-2661. 1986.
- 2.- Shope Robert E.: Medical significance of togaviruses: - An overview of diseases caused by togaviruses in man - - and in domestic and wild vertebrate animals. En: The toga viruses Biology, Structure, Replication. New York. Ed. - Schlesinger R.W., Academic Press 1980, pp 47-81.
- 3.- Carrada B.T.; Vázquez V.L.; López G.I.: Ecología del --- dengue y el Aedes aegypti. Investigación preliminar. -- Salud Pública Méx. 26 (1):63-76, 1984.
- 4.- Cantelar de Francisco N.: Fiebre Hemorrágica por dengue- (FHD) Sudeste Asiático y Pacífico Occidental. Rev.Cub.- Med. Trop. 35(2):130-135, 1983.
- 5.- Figueroa M.; Pereira R.; Gutiérrez H.; de Mejía C. y - Padilla N.: La epidemia de dengue en Honduras 1978-1980. Bol Of Sanit Panam. 93(5):434-441, 1982:
- 6.- Cantelar de Francisco N.: Dengue en el Caribe y las Amé ricas (artículo revisión) (II parte). Rev.Cub.Med.Trop. 35 (2):136-153, 1983.
- 7.- Trent D.W.; Grant J.A.; Rosen L. y Monath T.P.: Genetic variation among dengue 2 viruses of different geogra -- phic origin. Virology. 128:271-284, 1983.
- 8.- Halstead Scott B.: Immunological parameters of togavi - rus diseases syndromes. En: The Togaviruses Biology, -- Structure, Replication. New York. Ed. Schlesinger R.W.- Academic Press 1980 pp 107-168.
- 9.- Carrada B.T.; Vázquez V.L.; López G.I.: La ecología del dengue y el Aedes aegypti. Investigación preliminar. -- cuarta parte. Salud Pública Méx. 26(5):501-516, 1984.
- 10.- Kaplan J.E.; Eliason D.A.; Moore M.; Sather G.E.; Schon - berger L.B.; Cabrera L.Coello y Fernández de C.J.: Epi - demiologic investigations of dengue infection in México, 1980. Am J Epidemiol 117(3):335-343.
- 11.- Eliason D.A.; Zorrilla E.; Magos C. y col.: Valoración - de índices del riesgo de transmisión de dengue. Sal.Púb. Méx. 25 (4):411-417, 1983.
- 12.- Carrada B.T.; Plaza L.J.: El dengue en México. Nota pre - liminar. Rev. Med. IMSS (Méx) 24:65-70, 1986.

- 13.- Carrada B.T.: La epidemiología del dengue en América -- 1982-1984. Quinta parte. Sal Púb Méx 29 (1):15-25, 1987.
- 14.- Boletín de epidemiología. Secretaría de Salubridad y -- Asistencia. Sector Salud México. 2 (6):61-71, 1987.
- 15.- Boletín de epidemiología. Secretaría de Salubridad y - Asistencia, Sector Salud México. 3(6):58-66, 1988.
- 16.- Carrada B.T.; Vázquez V.L.; López G.I.: La ecología del dengue y el Aedes aegypti. Investigación preliminar. - Tercera parte. Salud Pública de México. 26(3):297-311, - 1984.
- 17.- Moore C.G.; Cline B.L.; Ruíz E.-Tibén, Lee D.; Rommey H. Joseph y Rivera E. Correa.: Aedes aegypti in Puerto Rico. Environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. Am J Trop Med Hyg. 27 (6):1225-1231, 1978.
- 18.- Argüelles J.M.; Hernández M. y Mazart I.: Evaluación nutricional de niños y adolescentes con diagnóstico de -- dengue. Bol Of Sanit Panam. 103 (3):245-250, 1987.
- 19.- Hafkin B.; Kaplan J.E.; Reed C.; Bruce E.L.; Fontaine R.; Sather G.E. y Kappus K.: Reintroduction of dengue fever into the Continental United States. Am J Trop Med Hyg. 31. (6):1222-1228, 1982.
- 20.- Kho L.K.; Setiawan M. y Himawan T.: Disseminated intravascular coagulation in dengue haemorrhagic fever. Mod-Med Asia 12 (2):10-13, 1976.
- 21.- Gubler D.J.; Suharyono W.; Lubis I.; Eram S. y Sulianti - S.J.: Epidemic dengue haemorrhagic fever in rural Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 28 (4):701-710, 1979.
- 22.- Guzmán M.G.; Kourí G.; Morier L.; Soler M. y Fernández A.: Casos mortales de dengue hemorrágico en Cuba, 1981. -- Bol Of Sanit Panam. 97 (2):111-117, 1984.
- 23.- Dubois-Dalcq, Monique; Holmes, K.V.: Campos E.; Valdespino - J.: Assembly of Togaviridae En: Assembly of enveloped - RNA viruses. Kingsburg D.W. Wien New York Ed. Springer - Verlag. 1984 pp 120-148.
- 24.- Gubler D.J.; Kuno G.; Sather G.E.; Velez M. y Oliver A.: Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med-Hyg 33 (1):158-165, 1984.
- 25.- Kumate J. (1985): Dengue. En: Kumate J. y Gutiérrez G. - Eds. Manual de infectología. Undécima edición. F.M. Cervantes, México pp 454-462.
- 26.- Clarke D.H. y Casals J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with Arthropod - Borne Viruses. Am J Trop Med Hyg 7 (5):561-573, 1958.

- 27.- Schlesinger R.W.: Dengue Virus. En: Virology Mono - graphs 16. New York. Ed. Springer-Verlag. 1982 pp - - 14-105.
- 28.- Kuberski T.T. y Rosen L.: Identification of dengue vi ruses using complement fixing antigen produced in mos- quitoes. Am J Trop Med Hyg. 26: 538-543.
- 29.- Dittmar D.; Cleary T.J. y Castro A.: Immunoglobulin - G- and M- Specific Enzyme-Linked Immunosorbent - - - - Assay for detection of dengue antibodies. Journal of - Clinical Microbiology. 9 (4):498-502,1979.
- 30.- Kuno G.: A continuous cell line of a nonhematophagous- mosquito, Toxorhynchites amboinensis. In vitro 16 (11): 915-917, 1980.
- 31.- Kuberski T.T. y Rosen L.: A simple technique for the- detection of dengue antigen in mosquitoes by immuno -- fluorescence. Am J Trop Med Hyg 26 (3):533-537. 1976.
- 32.- Henchal E.A.; Gentry M.K.; Mc Cown J.M. y Brandt W.E.: Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immu nofluorescence. Am J Trop Med Hyg 31 (4):830-836,1982.
- 33.- Enciclopedia de México. Cuarta edición. México Edit. - Porrúa 1978, 201-204.
- 34.- Boletín de Epidemiología. Secretaría de Salubridad y- Asistencia. Sector Salud México. 1 (7): 86-99.
- 35.- Center for Disease Control Public Health Service and- Panamerican Health Organization. Dengue Diagnostic -- Laboratory procedures for the Americas. A Manual 1981.
- 36.- Dengue surveillance summary. Center for Disease Con - trol No. 29, January 1986.
- 37.- Dengue surveillance summary. Center for Disease Control No. 49, December. 1987.
- 38.- Guiscafré Gallardo J.P.; Luna Jaramillo M.; Bustamente Calvillo M.E.; Alvarez Muñoz M.T.; Martínez García M.C; Flores Huerta S.; Moreno Altamirano L. y Muñoz Hernán- dez O.: Seroepidemiología del dengue en comunidades de la frontera sur del Estado de Chiapas, México. Arch In vest Med (Mex) 17 (4): 369-377, 1986.

ANEXO 1.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA

Apdo. Postal 70-228, 04510 México, D.F.
Tels.: 550-3982 y 550-5215 Ext. 3583

INVESTIGACION DE CASOS DE DENGUE

Nombre Filiberto Bernaldo Sopeña.
Dirección Vicente Guerrero S/N.
Xoxcotla, Morelos.
Teléfono _____

Lugar de trabajo Xoxcotla, Morelos.
Sexo: Masculino * Femenino _____ Edad: 16 Años _____
Fecha de nacimiento 99-09-71.

	Mes	Días	Año
Inicio del padecimiento actual	<u>08</u>	<u>06</u>	<u>87</u>
Fecha de toma de muestra:			
Primera muestra	<u>08</u>	<u>06</u>	<u>87</u>
Suero Segunda muestra	_____	_____	_____
Tercera muestra	_____	_____	_____
Otro origen.	_____	_____	_____

DATOS CLINICOS

	Si	No	No se sabe
Hipertermia (fiebre)	*	_____	_____
Anorexia (falta apetito)	*	_____	_____
Cefalea (dolor de cabeza)	*	_____	_____
Dolor ocular (dolor de ojos)	*	_____	_____
Mialgias (dolor muscular)	*	_____	_____
Artralgias (dolor de coyunturas)	*	_____	_____
Odinofagia (dolor de garganta)	_____	*	_____
Congestión nasal (constipación)	_____	*	_____
Rash (erupción)	_____	*	_____
Náuseas	_____	*	_____
Vómito	_____	*	_____
Diarrea	_____	*	_____
Escalofrío	_____	*	_____
Tos	_____	*	_____
Petequias (puntos rojos en la piel)	_____	*	_____
Equimosis (moretones)	_____	*	_____
Hematemesis (vómito con sangre)	_____	*	_____
Melena (sangre en heces)	_____	*	_____
Epistaxis (sangrado nasal)	*	_____	_____
Gingivorragia (hemorragia de encías)	_____	*	_____
Hematuria (sangre en orina)	_____	*	_____
Sangrado transvaginal	_____	*	_____
Ictericia (piel amarillenta)	_____	*	_____
Linfadenopatía periférica	_____	*	_____
(ganglios crecidos)	_____	_____	_____

DATOS CLINICOS ADICIONALES

	Si	No
Hipovolemia	*	_____
Hipotensión	*	_____
Bradicardia	*	_____
Estado de vigilia	*	_____
Acidosis-Alcalosis	_____	*
Hipoxia	_____	*
Hepato-esplenomegalia	_____	*
Derrame pleural	_____	*
Otros:	_____	*

DATOS ADICIONALES

- 1.- En que país nació? México.
- 2.- Tuvo dengue antes? (Fiebre, dolor del cuerpo, dolor de ojos, erupción)
Si _____ No * _____ No sabe _____
- 3.- Cuando? (mes, año) _____
- 4.- Cuantos años ha vivido en este lugar 16 años.
- 5.- Durante los 10 días antes de enfermarse, viajó a otro pueblo ó país?
Si _____ No * _____ No se sabe _____
- 6.- A donde viajó? _____
- 7.- Faltó al trabajo ó escuela por tener dengue?
Si * _____ No _____ No sabe _____ Cuántos días faltó? _____
- 8.- Comentarios: _____

¿Algún miembro de su familia ha tenido Dengue? Si _____ No * _____
 Hace cuanto tiempo _____ Lugar donde vive _____

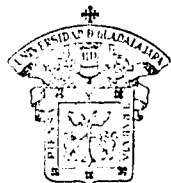
En qué época del año son más frecuentes los casos de Dengue en el lugar donde usted vive Temporada de Lluvias.

Médico que refiere el caso Dr. José Manuel García.

Dirección y Teléfono Av. 20 de Noviembre N° 25.

Hospital o clínica C.S.R.C. Xoxocotla, Morelos.

Para uso exclusivo del Laboratorio			
Aislamiento	Si _____	No <u>X</u>	
Serotipo _____			
Ag	HI	FC	NT
Dengue 1	<u>20480</u>	_____	_____
Dengue 2	<u>2560</u>	_____	_____
Dengue 3	<u>20480</u>	_____	_____
Dengue 4	<u>10240</u>	_____	_____
Fiebre Amarilla	_____	_____	_____
Encefalitis de San Luis	_____	_____	_____
Otros	_____	_____	_____



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
 Número **1556/87**

SRITA. ANABELL ALVARADO NAVARRO
 P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
 tema de Tesis "ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DEL DENGUE EN ALGUNAS POBLA -
 CIONES DEL ESTADO DE MORELOS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -
 Director de dicha Tesis el Dr. Eduardo Vázquez Valls.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., ~~Diciembre~~ 17 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna



FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El Dr. Eduardo Vázquez Valls, Director de Tesis.-Pte.
 c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Al contestar este oficio cítese fecha y número

GUADALAJARA, Jal., a 16 de marzo de 1989.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA.

P R E S E N T E .

Por medio de la presente, me permito manifestara usted que -
una vez recibida la tesis "ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DEL DEN-
GUE EN ALGUNAS POBLACIONES DEL ESTADO DE MORELOS", presentada
por la C. pasante de la carrera de Licenciado en Biología -
ANABELL ALVARADO NAVARRO y haber realizado las observaciones -
pertinentes, considero que se puede imprimir y solicito a usted
atentamente se realicen los trámites para el examen respectivo.

Agradezco de antemano las atenciones que se sirvan prestar, -
para cualquier aclaración al respecto.

A T E N T A M E N T E



DR. EDUARDO YÁÑEZ VALLS
Director de la tesis.