



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN  
PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES  
DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)**

**CYNTHIA MAGDALENA BERNAL VERA**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias  
Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

Junio, 2021





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL  
DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y  
EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE,  
PARAGUAY (2018-2020)**

**CYNTHIA MAGDALENA BERNAL VERA**

**Tutor: MSc. FÁTIMA CARDOZO**

**Co-tutores: PROF. DR. JESSE WAGGONER, MD  
PROF. DRA. PATRICIA LANGJAHR**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

Junio, 2021

Bernal Vera, Cynthia Magdalena

Caracterización de infecciones por el virus del dengue en pacientes con sospecha clínica y evaluación de marcadores de gravedad de dengue, Paraguay (2018-2020) / Cynthia Magdalena Bernal Vera, Tutor: Fátima Cardozo Segovia, Co tutor: Jesse Waggoner, Patricia Langjahr Penayo. -- San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

iv, 102; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas). – UNA, IICS, FCQ; 2021.

1. Dengue 2. Virus del dengue 3. Proteína de unión a lipopolisacáridos 4. Quimazas. I. Título

CDD (ed.18ª) 616.921  
B456c



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

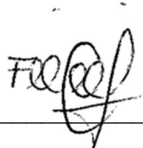
Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.

**LA BIOQ. MSC. FÁTIMA MARÍA CARDOZO SEGOVIA**, DOCENTE INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Cynthia Magdalena Bernal Vera** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 30 días del mes de marzo de 2021.



---

**Tutora: MSc. Fátima Cardozo**

EL **PROF. DR. JESSE WAGGONER, MD** DOCENTE INVESTIGADOR DE LA ESCUELA DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE EMORY.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Cynthia Magdalena Bernal Vera** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 30 días del mes de marzo de 2021.



---

**Co-Tutor: Prof. Dr. Jesse Waggoner, MD**

**LA PROF. DRA. PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO**, DOCENTE INVESTIGADORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Cynthia Magdalena Bernal Vera** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 30 días del mes de marzo de 2021.



---

**Co-Tutora: Prof. Dra. Patricia Langjahr**



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc,**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA  
UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN  
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **Cynthia Magdalena Bernal Vera** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección la docente investigadora **Fátima Cardozo, MSc.** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 25 días del mes de junio de 2021.

---

**B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.**  
**Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Caracterización de Infecciones por el Virus del Dengue en Pacientes con Sospecha  
Clínica y Evaluación de Marcadores de Gravedad de Dengue, Paraguay (2018-  
2020)**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Cynthia Magdalena Bernal Vera

Aprobado el 25 de junio de 2021

Tribunal examinador:

Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,  
Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Dra. Iara Magaly Martínez Pereira, PhD, Instituto de Investigaciones en Ciencias de  
la Salud, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Dr. Julio Cesar Masaru Iehisa Ouchi, PhD, Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

---

Fátima María Cardozo Segovia, MSc.

---

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.  
Directora de Postgrado FCQ

## DEDICATORIA

*Para mamá, la Sra. Gloria Vera. Porque gracias a su lucha incansable en la vida, pude tener el lujo de soñar como quiera y estudiar, pude terminar el colegio, graduarme en la Universidad y no solo eso, también terminar un posgrado. Algo que muy pocos han logrado en nuestra familia. Y sé que aún puedo ir más allá.  
¡Gracias, mamá!*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi tutora, Fátima, por abrirme paso a esta gran oportunidad.*

*A mis co-tutores, los Dres. Jesse y Patricia, por el apoyo constante.*

*A Alejandra Rojas y a todos los miembros del Equipo Arbovirus del IICS.*

*A mi familia, por el apoyo.*

*A mi novio David que me acompañó en las noches de trabajo.*

*A todos los profesores de la maestría.*

*A mis compañeros de maestría.*

*A los miembros de los Departamentos de Salud Pública y de Producción.*

*A los evaluadores, por aportar sus puntos de vista.*

*A los miembros del Departamento de Docencia del IICS y a la Coordinación de  
Posgrado.*

*Al CONACYT.*

*¡Gracias!*

# CARACTERIZACIÓN DE INFECCIONES POR EL VIRUS DEL DENGUE EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA Y EVALUACIÓN DE MARCADORES DE GRAVEDAD DE DENGUE, PARAGUAY (2018-2020)

Cynthia Bernal<sup>1</sup>, Fátima Cardozo<sup>2</sup>, Jesse Waggoner<sup>3</sup>, Patricia Langjahr<sup>4</sup>

1. Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción
2. Departamento de Salud Pública del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción
3. Departamento de Medicina, División de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Medicina, Universidad de Emory
4. Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

## RESUMEN

El dengue es la enfermedad transmitida por vectores de mayor impacto a nivel mundial después de la malaria. La mayoría de los casos son leves pero un porcentaje variable puede evolucionar a dengue grave (DG), con alta letalidad, por lo que es importante identificar qué pacientes desarrollarán esta forma. El objetivo de este estudio fue caracterizar casos de dengue en pacientes con sospecha clínica y evaluar la quimasa (CMA-1) y la proteína transportadora de lipopolisacárido (LBP) como marcadores de gravedad. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. Fueron reclutados 1.490 pacientes con sospecha de dengue entre 2018 y 2020. 60% fue del sexo femenino y 54,9% tuvo  $\leq 30$  años. Los síntomas más frecuentes fueron fiebre (92%), cefalea (79%), mialgia (75%) y artralgia (68%). 508 casos fueron confirmados y el tipo 4 del virus del dengue fue el más frecuentemente detectado. Fueron seleccionados 145 casos de dengue confirmado y clasificados de acuerdo con la gravedad según los criterios de la OMS, 2009 en 3 grupos: dengue sin signos de alarma (DSSA, n=55), dengue con signos de alarma (DCSA, n=67) y DG (n=23). Se compararon las concentraciones de CMA-1 y LBP en estos grupos y se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Los niveles de ambas proteínas aumentaron conforme a la gravedad de los casos. La concentración de CMA-1 fue significativamente mayor en pacientes con DG al comparar con las de los grupos DSSA y DCSA ( $p=0,0003$  y  $p=0,0005$ , respectivamente). Para el estudio de LBP, un grupo de controles sanos (CS, n=55) fue incluido, y las concentraciones de LBP fueron significativamente mayores al comparar DG con todos los demás grupos ( $p \leq 0,0001$ , para DG vs. CS, DG vs. DSSA y DG vs. DCSA, respectivamente). La concentración del grupo DCSA fue significativamente mayor al de CS ( $p=0,0004$ ). Este estudio presenta datos colectados durante la epidemia más grande del Paraguay y representa el primer reporte de CMA-1 en pacientes con dengue del continente americano y de LBP en pacientes con dengue de Paraguay. Se demostró el potencial de CMA-1 y LBP como marcadores de gravedad, respaldado por reportes previos. El poder predictivo debe evaluarse con un diseño de cohorte.

**Palabras claves:** Dengue, virus del dengue, proteína de unión a lipopolisacáridos, quimasas.

# CHARACTERIZATION OF DENGUE VIRUS INFECTIONS IN PATIENTS WITH CLINICAL SUSPICION AND EVALUATION OF DENGUE SEVERITY MARKERS, PARAGUAY

(2018-2020)

Cynthia Bernal<sup>1</sup>, Fátima Cardozo<sup>2</sup>, Jesse Waggoner<sup>3</sup>, Patricia Langjahr<sup>4</sup>

1. Master's Degree in Biomedical Sciences' Student, Institute for Research in Health Sciences, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción
2. Department of Public Health, Institute for Research in Health Sciences, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción
3. Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, School of Medicine, Emory University.
4. Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Sciences, National University of Asunción

## ABSTRACT

Dengue is the most impactful vector-borne disease worldwide after malaria. Most cases are mild but a variable percentage can evolve to severe dengue (DG), with high lethality, so it is important to identify which patients will develop this form. The aim of this study was to characterize suspected cases of dengue and evaluate chymase (CMA-1) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) as markers of severity. A cross sectional study was performed. 1,490 patients with suspected dengue were recruited between 2018 and 2020. 60% were female and 54.9% were  $\leq 30$  years old. The most common symptoms were fever (92%), headache (79%), myalgia (75%) arthralgia (68%). 508 cases were confirmed, and type 4 of the dengue virus was the most frequently detected. 145 cases of confirmed dengue were selected and classified according to WHO criteria, 2009 in 3 groups: dengue without alarm signs (DSSA, n=55), dengue with alarm signs (DCSA, n=67) and DG (n=23). The concentrations of CMA-1 and LBP in these groups were compared and a  $p < 0.05$  was considered significant. Levels of both proteins increased according to the severity of the cases. The concentration of CMA-1 was significantly higher in patients with DG when compared to those of the DSSA and DCSA groups ( $p = 0.0003$  and  $p = 0.0005$ , respectively). For the LBP study, a group of healthy controls (CS, n=55) was included, and LBP concentrations were significantly higher when comparing DG with all other groups ( $p < 0.0001$  for DG vs. CS, DG vs. DSSA and DG vs. DCSA). The concentration of the DCSA group was significantly higher than that of CS ( $p = 0.0004$ ). This study presents data collected during Paraguay's largest epidemic and represents the first CMA-1 report in dengue patients from the Americas and LBP in dengue patients in Paraguay. The potential of CMA-1 and LBP was demonstrated as severity markers, backed by previous reports. Predictive power must be evaluated with a cohort design.

**Keywords:** Dengue, dengue virus, lipopolysaccharide binding protein, chymase.

## ÍNDICE

|                                                                 |       |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| RESUMEN.....                                                    | xiii  |
| ABSTRACT.....                                                   | 14xiv |
| LISTA DE FIGURAS.....                                           | xviii |
| LISTA DE TABLAS .....                                           | xx    |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                     | xxii  |
| CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO .....                                 | 24    |
| 1.1 Generalidades.....                                          | 24    |
| 1.1.1 El virus del dengue.....                                  | 24    |
| 1.1.2 Ciclo de transmisión del DENV.....                        | 27    |
| 1.1.3 Células infectadas por el DENV .....                      | 27    |
| 1.2 Dengue: la enfermedad .....                                 | 28    |
| 1.2.1 Manifestaciones clínicas y hallazgos laboratoriales ..... | 29    |
| 1.2.2 Diagnóstico de dengue .....                               | 31    |
| 1.2.3 Casos graves de dengue y marcadores de gravedad.....      | 33    |
| 1.3 Epidemiología del dengue.....                               | 35    |
| 1.3.1 Dengue en las Américas.....                               | 35    |
| 1.3.2 Dengue en Paraguay.....                                   | 36    |
| 1.4 Justificación.....                                          | 38    |
| CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....                                      | 39    |
| 2.1 Objetivo general.....                                       | 39    |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                 | 39    |
| CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA .....                                   | 40    |
| 3.1 Diseño y población de estudio .....                         | 40    |
| 3.1.1 Reclutamiento .....                                       | 41    |
| 3.1.2 Muestras.....                                             | 42    |
| 3.2 Mediciones .....                                            | 42    |
| 3.2.1 Encuestas .....                                           | 43    |
| 3.2.2 Parámetros laboratoriales.....                            | 43    |
| 3.2.3 Detección de antígeno NS1 de DENV.....                    | 43    |
| 3.2.4 Detección de anticuerpos IgM e IgG anti-DENV.....         | 44    |
| 3.2.5 Detección de genoma de DENV por rRT-PCR .....             | 44    |
| 3.2.6 Tipificación de DENV y determinación de carga viral ..... | 45    |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.7 Criterio de confirmación de casos de dengue .....                                                                   | 46 |
| 3.2.8 Clasificación de casos de dengue de acuerdo con los criterios de la OMS, 2009 .....                                 | 46 |
| 3.2.9 Detección del índice anticuerpos IgG e IgM anti-DENV .....                                                          | 47 |
| 3.2.10 Determinación de CMA-1 .....                                                                                       | 48 |
| 3.2.11 Determinación de LBP.....                                                                                          | 49 |
| 3.3 Análisis estadísticos .....                                                                                           | 50 |
| 3.4 Aspectos éticos.....                                                                                                  | 51 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS .....                                                                                              | 52 |
| 4.1 Pacientes con cuadro sospechoso de dengue .....                                                                       | 52 |
| 4.1.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes con sospecha de dengue .....                               | 53 |
| 4.1.2 Detección de antígeno NS1, ARN de DENV y anticuerpos anti-DENV en pacientes con sospecha de dengue .....            | 56 |
| 4.2 Selección de casos de dengue y clasificación según criterios OMS, 2009 .....                                          | 57 |
| 4.2.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes con dengue seleccionados .....                             | 57 |
| 4.2.2 Resultados de pruebas laboratoriales de pacientes confirmados de dengue .....                                       | 59 |
| 4.2.3 LBP y CMA-1 en pacientes con dengue confirmado .....                                                                | 66 |
| CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....                                                                                                | 73 |
| 5.1 Pacientes con sospecha de dengue .....                                                                                | 73 |
| 5.2 Selección de casos de dengue y clasificación según criterios OMS, 2009 .....                                          | 74 |
| 5.3 Hallazgos laboratoriales .....                                                                                        | 77 |
| 5.4 Determinación de CMA-1 .....                                                                                          | 79 |
| 5.5 Determinación de LBP .....                                                                                            | 81 |
| CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....                                                                                             | 84 |
| 7. PERSPECTIVAS .....                                                                                                     | 85 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                        | 86 |
| 9. ANEXOS .....                                                                                                           | 95 |
| 9.1 Anexo 1: Encuesta utilizada para colecta de datos demográficos y clínicos durante el reclutamiento de pacientes. .... | 95 |
| 9.2 Anexo 2: Formularios de consentimiento informado.....                                                                 | 97 |
| 9.2.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado por escrito.....                                       | 97 |



|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 9.2.2 Hoja de información asentimiento informado. ....                                                                                           | 101 |
| 9.2.3 Hoja de información para consentimiento verbal.....                                                                                        | 103 |
| 9.3 Anexo 3: Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en este estudio.....                                                                    | 105 |
| 9.4 Anexo 4. Procedencia por ciudad del Departamento Central de pacientes con<br>sospecha de dengue. ....                                        | 108 |
| 9.6 Anexo 6: Listado de clasificación de pacientes con dengue, resultados de LBP y<br>CMA-1, edad, sexo, comorbilidades y signos de alarma. .... | 109 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                        | <b>Página</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Figura 1.1</b> Esquema de escisión de la poliproteína genómica del DENV (A) y estructura del viral (B).                                             | 25            |
| <b>Figura 1.2</b> Fases del dengue y características.                                                                                                  | 29            |
| <b>Figura 1.3</b> Cinética de la viremia, antigenemia y anticuerpos en pacientes con dengue según días de síntomas en infección primaria y secundaria. | 32            |
| <b>Figura 1.4</b> Esquema que representa el impacto de la desgranulación de mastocitos y CMA-1 sobre la permeabilidad vascular.                        | 35            |
| <b>Figura 1.5</b> Incidencia de dengue por cada 100.000 habitantes.                                                                                    | 36            |
| <b>Figura 3.1</b> Ubicación de los puntos de muestreo de pacientes.                                                                                    | 40            |
| <b>Figura 3.2</b> Esquema general de trabajo.                                                                                                          | 43            |
| <b>Figura 3.3</b> Curva de calibración para CMA-1.                                                                                                     | 49            |
| <b>Figura 3.4</b> Curva de calibración para LBP.                                                                                                       | 50            |
| <b>Figura 4.1</b> Flujo de muestras incluidas en cada etapa de trabajo.                                                                                | 52            |
| <b>Figura 4.2</b> Resultados de antígeno NS1 de dengue y rRT-PCR para dengue versus días de síntomas en el cual fue realizado la prueba.               | 61            |
| <b>Figura 4.3</b> Carga viral versus (vs.) días de síntomas en 105 muestras de pacientes con dengue seleccionados para el estudio de marcadores.       | 61            |
| <b>Figura 4.4</b> Resultados de anticuerpos IgM e IgG anti-DENV vs. días de síntomas en el que fue realizada la prueba.                                | 62            |
| <b>Figura 4.5</b> Comparaciones de leucocitos, plaquetas, GOT y bilirrubina total entre grupos de pacientes con dengue confirmado.                     | 64            |
| <b>Figura 4.6</b> Comparaciones de fosfatasa alcalina, urea y creatinina entre grupos de pacientes con dengue confirmado.                              | 65            |
| <b>Figura 4.7</b> Comparación de concentraciones de LBP en los controles sanos y grupos de pacientes DSSA, DCSA y DG.                                  | 66            |
| <b>Figura 4.8</b> Comparación de concentraciones de LBP de acuerdo con la comorbilidad en los pacientes incluidos.                                     | 67            |

- Figura 4.9** Concentraciones de LBP en grupos de pacientes separados de 68  
acuerdo con el padecimiento o no de comorbilidades.
- Figura 4.10** Comparación de concentraciones de CMA-1 según grupos de 69  
pacientes DSSA, DCSA y DG.
- Figura 4.11** Comparación de concentraciones de CMA-1 según grupos de 70  
pacientes por comorbilidad.
- Figura 4.12** Análisis de correlación de concentraciones de CMA-1 vs. 70  
concentraciones de LBP en pacientes con dengue.
- Figura 4.13** Análisis de correlación de concentraciones de CMA-1 vs. 71  
concentraciones de LBP.

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabla 1.1</b> Clasificación de casos de dengue y niveles de gravedad según criterios de la OMS, 2009.                                                       | 31     |
| <b>Tabla 4.1</b> Distribución de frecuencias de edades de pacientes con sospecha de dengue.                                                                    | 53     |
| <b>Tabla 4.2</b> Distribución de procedencia por departamento de pacientes con sospecha de dengue.                                                             | 54     |
| <b>Tabla 4.3</b> Datos clínicos de casos sospechosos y confirmados de dengue.                                                                                  | 55     |
| <b>Tabla 4.4</b> Resultados de pruebas de dengue realizadas a los pacientes con sospecha de clínica.                                                           | 56     |
| <b>Tabla 4.5</b> Grupos de pacientes de dengue clasificados según la guía OMS, 2009 y criterios utilizados para parear los pacientes entre los grupos (N=145). | 57     |
| <b>Tabla 4.6</b> Características clínicas de pacientes de dengue clasificados según criterios de la OMS, 2009.                                                 | 60     |
| <b>Tabla 4.7</b> Datos laboratoriales de pacientes con dengue confirmado seleccionados para el estudio de marcadores. N=145.                                   | 63     |
| <b>Tabla 4.8</b> Resultados de marcados LBP y CMA-1. (Promedio y desviación estándar).                                                                         | 66     |
| <b>Tabla 4.9</b> Grupo, comorbilidades y concentración en muestras de pacientes con CMA-1 detectable.                                                          | 72     |
| <b>Tabla</b> Cebadores que se incluyeron en el ensayo ZCD.                                                                                                     | 105    |
| <b>Anexo 3.1</b>                                                                                                                                               |        |
| <b>Tabla</b> Sondas incluidas en el ensayo ZCD.                                                                                                                | 106    |
| <b>Anexo 3.2</b>                                                                                                                                               |        |
| <b>Tabla</b> Secuencias de cebadores para la detección del gen RNAsaP, utilizado como control interno en la reacción ZCD.                                      | 106    |
| <b>Anexo 3.3</b>                                                                                                                                               |        |
| <b>Tabla</b> Sondas para la detección del gen RNAsaP, utilizado como control interno en la reacción ZCD.                                                       | 106    |
| <b>Anexo 3.4</b>                                                                                                                                               |        |
| <b>Tabla</b> Cebadores utilizados para la reacción de tipificación de DENV.                                                                                    | 107    |
| <b>Anexo 3.5</b>                                                                                                                                               |        |

|                  |                                                                     |     |
|------------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla</b>     | Sondas utilizadas la reacción de tipificación de DENV.              | 107 |
| <b>Anexo 3.6</b> |                                                                     |     |
| <b>Tabla</b>     | Procedencia por ciudad del Departamento Central de pacientes con    | 108 |
| <b>Anexo 4</b>   | sospecha de dengue.                                                 |     |
| <b>Tabla</b>     | Listado de clasificación de pacientes con dengue, resultados de LBP | 109 |
| <b>Anexo 5</b>   | y CMA-1, edad, sexo, comorbilidades y signos de alarma.             |     |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

|                  |                                                                                                |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADE</b>       | Respuesta exacerbada dependiente de anticuerpos                                                |
| <b>ADNc</b>      | Ácido desoxirribonucleico complementario                                                       |
| <b>ARN</b>       | Ácido ribonucleico                                                                             |
| <b>C</b>         | Cápside                                                                                        |
| <b>CMA-1</b>     | Quimasa                                                                                        |
| <b>CS</b>        | Controles sanos                                                                                |
| <b>DCSA</b>      | Dengue con signos de alarma                                                                    |
| <b>DENV</b>      | Virus del dengue                                                                               |
| <b>DENV-1</b>    | Virus del dengue tipo 1                                                                        |
| <b>DENV-2</b>    | Virus del dengue tipo 2                                                                        |
| <b>DENV-3</b>    | Virus del dengue tipo 3                                                                        |
| <b>DENV-4</b>    | Virus del dengue tipo 4                                                                        |
| <b>DE</b>        | Desviación estándar                                                                            |
| <b>DG</b>        | Dengue grave                                                                                   |
| <b>DGVS</b>      | Dirección General de Vigilancia de la Salud                                                    |
| <b>DH</b>        | Dengue hemorrágico                                                                             |
| <b>DM</b>        | Diabetes mellitus                                                                              |
| <b>DSSA</b>      | Dengue sin signos de alarma                                                                    |
| <b>E</b>         | Envoltura                                                                                      |
| <b>ELISA</b>     | Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima                                                      |
| <b>GOT</b>       | Aspartato transaminasa                                                                         |
| <b>GPT</b>       | Alanina transaminasa                                                                           |
| <b>HC-IPS</b>    | Hospital Central del Instituto de Previsión Social                                             |
| <b>HTA</b>       | Hipertensión arterial                                                                          |
| <b>HVE</b>       | Hospital de Villa Elisa                                                                        |
| <b>IICS, UNA</b> | Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la<br>Universidad Nacional de Asunción |
| <b>IgE</b>       | Inmunoglobulina E                                                                              |
| <b>IgG</b>       | Inmunoglobulina G                                                                              |
| <b>IgM</b>       | Inmunoglobulina M                                                                              |

|                |                                                                           |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>kb</b>      | Kilobases                                                                 |
| <b>LBP</b>     | Proteína de transportadora de LPS                                         |
| <b>LPS</b>     | Lipopolisacárido                                                          |
| <b>MTasa</b>   | Metiltransferasa                                                          |
| <b>NS</b>      | Proteínas no estructurales                                                |
| <b>ORF</b>     | Marco abierto lectura                                                     |
| <b>PrM</b>     | Premembrana                                                               |
| <b>RC</b>      | Complejo de replicación multiproteico de unión a membrana                 |
| <b>RdRp</b>    | Polimerasa de ARN dependiente de ARN                                      |
| <b>RE</b>      | Retículo endoplasmático                                                   |
| <b>RIC</b>     | Rango intercuartílico                                                     |
| <b>RT-PCR</b>  | Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción                |
| <b>rRT-PCR</b> | Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real |
| <b>SIDA</b>    | Síndrome de inmunodeficiencia humana                                      |
| <b>SNC</b>     | Sistema nervioso central                                                  |
| <b>SSD</b>     | Síndrome de shock por dengue                                              |
| <b>TNF</b>     | Factor de necrosis tumoral                                                |
| <b>TTPA</b>    | Tiempo de tromboplastina parcial activada                                 |
| <b>UTR</b>     | Región no traducida                                                       |
| <b>VIH</b>     | Virus de la inmunodeficiencia humana                                      |
| <b>vs.</b>     | Versus                                                                    |
| <b>YFV</b>     | Virus de la fiebre amarilla                                               |
| <b>ZIKV</b>    | Virus del Zika                                                            |

## CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Generalidades

El dengue es una enfermedad infecciosa, aguda, no contagiosa causada por cualquiera de los cuatro tipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) y es actualmente una de las enfermedades tropicales más importantes del mundo (1) con una incidencia alarmantemente creciente en las últimas décadas (2). Genera grandes epidemias de alto impacto en salud pública en más de 100 países tropicales y subtropicales (3).

El DENV pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y, así como muchos de los miembros de este género, se transmite a los seres humanos a través de la picadura de vectores artrópodos, por lo que es clasificado como un arbovirus (del inglés *arthropod borne virus*, virus transmitido por artrópodos) (4).

#### 1.1.1 El virus del dengue

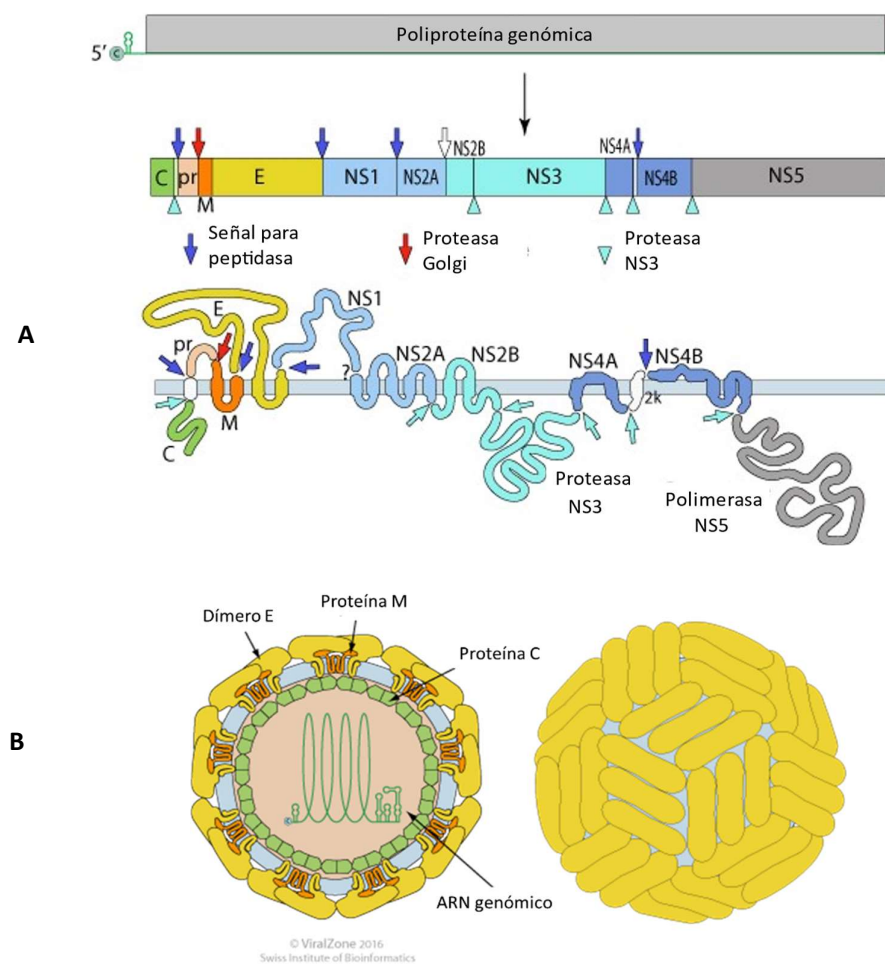
El DENV posee un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple, polaridad positiva y un tamaño de aproximadamente 10,7 kilobases (kb). Este genoma contiene un único marco abierto lectura (ORF) flanqueado en su extremo 5' por una región no traducida (UTR) de unos 100 nucleótidos y un UTR más largo de unos 500 nucleótidos en el extremo 3' (5). Los cuatro tipos conocidos de DENV comparten aproximadamente el 65%-70% de sus secuencias nucleotídicas (6).

El ORF se traduce como un único polipéptido con secuencias señal que dirigen su translocación varias veces a través de la membrana del retículo endoplasmático para luego ser escindido por proteasas virales y celulares dando lugar a diez proteínas: tres estructurales y siete no estructurales (**Figura 1.1**).

Las proteínas estructurales son las de la cápside (C), premembrana (prM) y la envoltura (E), y conforman la estructura del virión. La proteína C constituye la nucleocápside que rodea al ARN genómico, a continuación se encuentra una bicapa lipídica derivada de la célula huésped y en ella se incrustan las proteínas prM y E (7).

La prM es escindida por la furina celular para generar la proteína M y el péptido pr, esto conlleva a la producción de viriones infecciosos maduros. El péptido pr interactúa con homodímeros de la glicoproteína E estabilizando y protegiendo su estructura (8).





**Figura 1.1.** Esquema de escisión de la poliproteína genómica del DENV (A) y estructura del virus (B). Imagen modificada, fuente: *Viral Zone* ([viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org))

La proteína E cumple un rol en la unión del virus a receptores celulares y en la fusión de las membranas celular y viral (7,9). Este proceso depende de la cepa viral y del tipo de célula, y un gran número de moléculas han sido descritas como posibles receptores (10).

Las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) son responsables de la replicación viral, el montaje y el escape de la respuesta inmune, funciones que dependen del ensamblaje de un complejo de replicación multiproteico de unión a membrana (RC, por sus siglas en inglés) compuesto por las diferentes NS y cofactores celulares (11).

La NS1 es una glicoproteína conservada que en el estadio temprano de la infección se asocia al complejo RC en forma de dímero en la membrana plasmática. En una fase más tardía, es secretada al torrente sanguíneo en forma de hexámero y contiene la respuesta inmune interactuando con proteínas del complemento (11). Se trata de la única proteína del DENV que es secretada y esto ha dado lugar al desarrollo y aplicación de la detección de NS1 en el diagnóstico de la infección (5).

La proteína NS3 es muy conservada entre los flavivirus y posee varias funciones, actúa como una proteasa en un complejo con la proteína NS2B para el procesamiento de la poliproteína viral en los sitios de unión NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4B-NS5 (12) (**Figura 1.1**). También actúa como trifosfatasa para el *capping* del ARN viral, y helicasa para desenrollar la forma replicativa del ARN viral (13).

La proteína NS4 da origen a NS4A y NS4B. NS4A se ancla a la membrana del retículo endoplasmático y participa en la replicación viral induciendo autofagia, lo cual es importante para evitar que las células mueran durante la infección viral (14). Igual que su par, la NS4B es hidrofóbica y transmembranal y permite la disociación del dominio helicasa de NS3 del ARN viral (15).

La proteína NS5 es la más conservada de todas, posee dominios funcionales de metiltransferasa (MTasa) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Su presencia en el núcleo de la célula infectada da indicios de que, además de su función en la replicación viral, también posee un efecto en la supresión de la respuesta inmune antiviral (16). Dímeros de NS5 se asocian con NS3 y NS2B para formar el complejo RC, esencial para la síntesis de ARN viral (17).

Luego de la unión del virus a la célula a través de la proteína E, el virus se introduce dentro de la célula por el mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El pH ácido en el endosoma induce una trimerización irreversible de la proteína E, mediando así la fusión de las membranas viral y endosomal, lo cual genera el desnudamiento de la nucleocápside y la liberación del genoma viral al citoplasma, en donde es traducido (18).

El ensamblaje del virus se produce en la superficie del retículo endoplasmático (RE) y, este virus aún inmaduro, luego se transporta al complejo de Golgi donde

ocurren modificaciones postraduccionales como la liberación de la proteína pr y la formación de complejos homodiméricos de la proteína E. Esto da lugar a la forma madura del virus que finalmente abandona la célula infectada por el mecanismo de exocitosis (18).

### **1.1.2 Ciclo de transmisión del DENV**

El ciclo de transmisión del DENV en medios urbanos se mantiene entre seres humanos y mosquitos del subgénero *Stegomyia* del género *Aedes* (*Ae.*) siendo el *Ae. aegypti* el vector primario en regiones tropicales y subtropicales (19).

Otras especies como *Ae. albopictus*, *Ae. polinesinosiensis*, miembros del complejo *Ae. scutellaris*, y *Ae. niveus* se consideran vectores secundarios (20).

Cuando el mosquito se alimenta de sangre infectada, el DENV ingresa e infecta el epitelio del intestino medio del mosquito, y a partir de allí se replica y dispersa hasta alcanzar las células salivales donde el DENV se replica activamente (21). La saliva, que contiene entonces el virus y también proteínas con propiedades angiogénicas, antihemostáticas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, es inoculada en la piel del próximo ser humano del cual se alimentará (22).

### **1.1.3 Células infectadas por el DENV**

Varios estudios han propuesto que las células fagocíticas mononucleares (monocitos, macrófagos y células dendríticas), hepatocitos, linfocitos, células endoteliales, astrocitos y neuronas pueden ser infectadas por DENV *in vitro*, pero no necesariamente es lo que ocurre *in vivo*, donde se menciona el efecto de citoquinas que cambian la permisividad de la célula (8,23). La presencia de ARN de DENV de polaridad negativa o de las proteínas NS3/NS5 en una célula en particular puede indicar replicación de DENV, ya que están implicadas en este proceso (23).

La piel es la primera barrera con la que se encuentra el virus luego de la picadura del mosquito vector, y en ella se han reconocido una amplia variedad de tipos celulares con roles importantes en la replicación viral como las células de Langerhans, macrófagos, monocitos, células dendríticas, queratinocitos, células endoteliales y mastocitos. Aunque de estos, los más importantes en la piel podrían ser los queratinocitos (24) en términos de cantidad de células infectadas, teniendo un rol

primordial en la dispersión del virus a través del reclutamiento de células mieloides al sitio de inoculación, donde también se infectan y luego migran de la piel a los nódulos linfáticos (24) favoreciendo allí una replicación mayor del DENV en monocitos, células dendríticas y macrófagos. Se ha encontrado evidencia de que células mastocíticas maduras aisladas de piel humana, además de ser infectadas en la piel, generan gránulos extracelulares que llevan el DENV a través de la linfa a varios órganos linfoides, aumentando la propagación viral (25).

La infección de células mononucleares de sangre periférica ha sido estudiada en pacientes con dengue, detectándose en ellos indicadores de replicación viral activa y una mayor activación de las mismas en pacientes con cuadros más graves (26).

Varios estudios reportan la infección de hepatocitos y células de Kupffer por DENV y esto podría estar relacionado con la hepatomegalia y elevación de transaminasas (GOT: aspartato transaminasa y GPT: alanina transaminasa), lo cual se presenta con frecuencias variables en diferentes estudios en pacientes graves y no graves (27–29).

Respecto al sistema nervioso central (SNC), no está claramente definida la capacidad replicativa del DENV en células del SNC pero se han reportado varios casos en los que fue posible detectar antígeno NS1 y ARN de DENV en líquido cefalorraquídeo de pacientes con anormalidades neurológicas (23,30).

## **1.2 Dengue: la enfermedad**

Los seres humanos pueden tener dengue más de una vez en la vida debido a la circulación de los cuatro tipos de DENV que se diferencian antigénicamente. Ante la primera exposición a un tipo de DENV, la respuesta inmune es neutralizante y protectora contra el mismo tipo durante un tiempo que aún no está claro, ya que se consideraba que era de por vida pero, recientes hallazgos demuestran que es posible la reinfección con el mismo tipo (31,32). Tras la primera infección, hay una protección temporal contra los otros 3 tipos de DENV que puede perdurar hasta 2 años (33), conocida como protección cruzada.

Luego de pasado este tiempo de protección cruzada, el individuo es susceptible a la infección con un nuevo tipo de DENV, es decir, una infección secundaria, que se

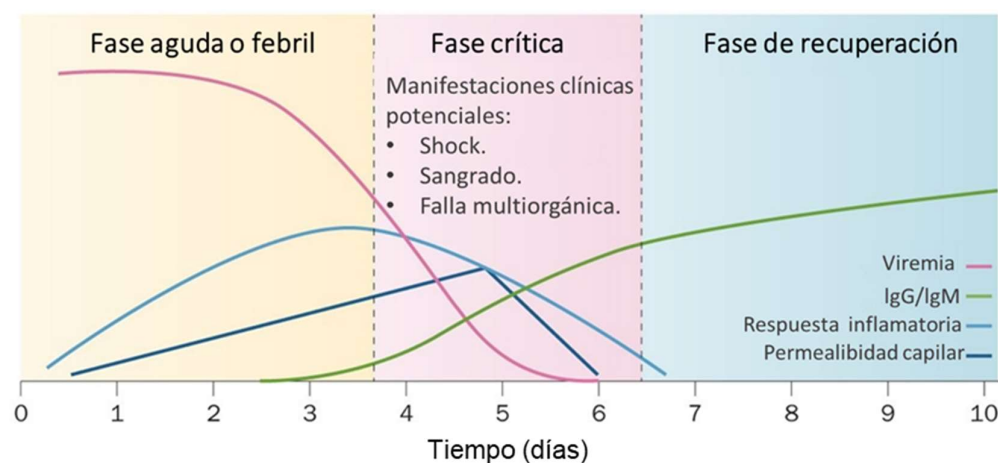
ha reconocido como un importante factor de riesgo para casos de dengue grave (34–36).

Se cree que las infecciones sucesivas a una secundaria, es decir, una tercera o cuarta infección con un tipo diferente de DENV, pueden ser sintomáticas pero raramente graves, debido a que la capacidad neutralizante de los anticuerpos se torna mayor y más eficiente (37).

### 1.2.1 Manifestaciones clínicas y hallazgos laboratoriales

Con un período de incubación de 2-7 días tras la picadura del mosquito, la infección por DENV puede resultar en un cuadro asintomático, que representa alrededor de 75% de los casos (38), o con un espectro amplio de manifestaciones clínicas que pueden ser leves hasta fatales. Estas manifestaciones evolucionan diferenciándose tres etapas en la enfermedad: la febril o aguda, la crítica, y la de recuperación o convalecencia (39) (**Figura 1.2**).

La fase aguda dura entre 3 a 7 días y aquí se ven los picos de viremia. Suele iniciarse con aparición brusca de fiebre acompañado de síntomas como dolor de cabeza (y zona retro orbital), náuseas, mialgia, artralgia, conjuntivitis, rash y/o leucopenia. Otros síntomas menos frecuentes son: tos, náuseas, vómitos y diarrea. Clínicamente puede ser difícil distinguir el dengue de otros síndromes febriles por la inespecificidad de los síntomas (39).



**Figura 1.2.** Fases del dengue y características. Modificado de Yacoub y col., 2014 (40)

La siguiente fase, caracterizada por la desaparición de la fiebre, puede durar alrededor de dos días y es la fase crítica donde los pacientes pueden recuperarse o empeorar. La trombocitopenia es frecuente y es utilizada como un marcador de enfermedad grave, sobre todo cuando el recuento es inferior a 100.000 plaquetas/uL. También pueden elevarse los niveles de GOT, GPT y fosfatasa alcalina, lo cual es utilizado como indicador de daño hepático (27).

Como evidencia de alteraciones en la coagulación, también puede verse un aumento en el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y disminución de los niveles de fibrinógeno. La mayoría de los pacientes se recupera en esta fase, pero en ciertos casos, pueden ocurrir cuadros clínicos más severos, con extravasación de plasma y hemorragia severa que pueden llevar a un shock hipovolémico y comprometer seriamente órganos como el hígado, el corazón y el SNC (41). En la fase convaleciente se normalizan todos los parámetros y el paciente se recupera en un periodo de tiempo que puede tomar de 2 a 5 días. La enfermedad producida por cualquiera de los tipos de DENV da como resultado el mismo rango de signos y síntomas clínicos (39).

Hasta el 2008, el dengue era clasificado de acuerdo con los criterios de clasificación de la OMS de 1997 en dengue, dengue hemorrágico y síndrome de shock por dengue (42). En el 2009, la OMS introdujo una clasificación revisada de casos reemplazando los términos anteriores por dengue sin signos de alarma (DSSA), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG). Para la clasificación en DCSA o DG basta con reunir uno de los criterios citados en la **Tabla 1.1** (39).

**Tabla 1.1:** Clasificación de casos de dengue y niveles de gravedad según criterios de la OMS, 2009. Modificado del Manual de manejo de pacientes OMS, 2009 (39).

| Dengue sin signos de alarma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Dengue con signos de alarma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Dengue grave                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Náuseas / vómitos</li> <li>2. Exantema</li> <li>3. Cefalea / dolor retroorbital</li> <li>4. Mialgia / artralgia</li> <li>5. Petequias o prueba del torniquete (+)</li> <li>6. Leucopenia.</li> </ol> <p>También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente</p> | <p>Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen</li> <li>2. Vómitos persistentes</li> <li>3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico)</li> <li>4. Sangrado de mucosas</li> <li>5. Letargo / irritabilidad</li> <li>6. Hipotensión postural (lipotimia)</li> <li>7. Hepatomegalia &gt;2 cm</li> <li>8. Aumento progresivo del hematocrito.</li> </ol> | <p>Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar &gt;2 segundos, presión de pulso <math>\leq 20</math> mmHg: hipotensión en fase tardía.</li> <li>2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC).</li> <li>3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT <math>\geq 1000</math> UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos.</li> </ol> |

### 1.2.2 Diagnóstico de dengue

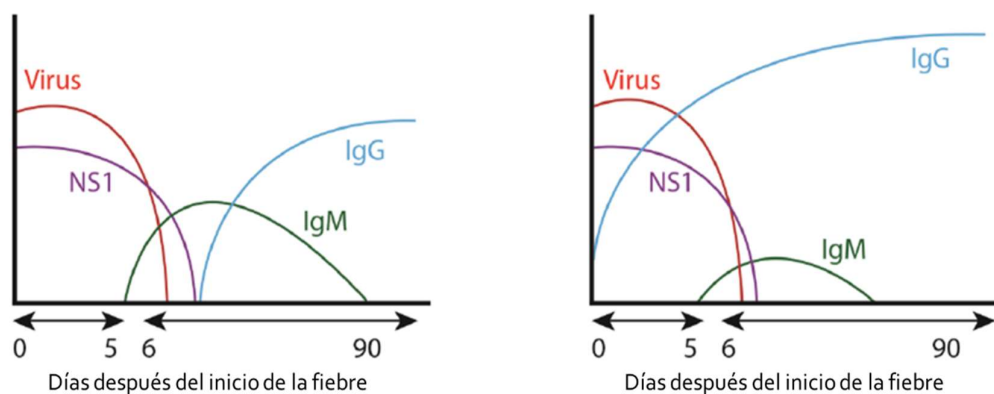
El diagnóstico del dengue puede hacerse por métodos directos, basados en la detección del virus o por métodos indirectos, basados en la detección de anticuerpos. La utilidad de cada tipo de prueba depende de los días transcurridos desde el inicio de los síntomas. Así es que, hasta el día quinto, se recomiendan el aislamiento del virus en cultivo viral o la amplificación del genoma viral por reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR). También es de utilidad el estudio de antígeno NS1 a través de dos técnicas posibles: el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) o por inmunocromatografía (prueba rápida) (39).

El diagnóstico serológico se basa en la detección de las inmunoglobulinas M y G (IgM o IgG) que se unen a antígenos del virus en la placa de un ELISA, o de una tira inmunocromatográfica en el caso de las pruebas rápidas. A partir del día 4-5 post inicio de síntomas, pueden detectarse anticuerpos IgM anti-DENV en muestras de

siero o plasma con un pico de concentración entre los 10 a 14 días de enfermedad, que luego desaparece a los tres meses siguientes aproximadamente (1). La seroconversión de IgM entre muestras pareadas se considera un hallazgo confirmatorio, mientras que la detección de IgM en una sola muestra con cuadro clínico de dengue se considera un diagnóstico presuntivo (39,43,44).

Los anticuerpos IgG pueden detectarse a partir del día 7 con una concentración que va en aumento durante los siguientes 15 días después de iniciado el cuadro, y se cree que su persistencia es de por vida confiriendo protección homóloga (45).

En el caso de infecciones secundarias heterólogas el panorama es un poco diferente (**Figura 1.3**). La detección de NS1 y de la viremia es menos sensible porque persisten menos días y los picos de viremia y antigenemia son más bajos debido a la reactividad inmunológica cruzada (35,46). Los anticuerpos IgM aparecen de forma variable y hasta pueden ser indetectables. Y por su parte, los anticuerpos IgG aparecen en concentraciones elevadas ya durante los primeros días de la enfermedad (44,46,47).



**Figura 1.3.** Esquema de niveles de viremia, antigenemia y anticuerpos en pacientes con dengue según días de síntomas en infección primaria (izquierda) y secundaria (derecha). Adaptado de Zhang y col., 2015 (48).

El diagnóstico por detección de anticuerpos no permite identificar el tipo de DENV infectante y, debido a las reacciones cruzadas, su especificidad es disminuida en regiones donde circulan otros flavivirus como el virus Zika (ZIKV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), y otros (49,50). También se han reportado reacciones cruzadas en la detección de NS1 para DENV y ZIKV (51).



Las pruebas rápidas para la determinación de antígeno NS1, IgM e IgG son muy útiles y han mejorado la accesibilidad al diagnóstico, pero debe tenerse en cuenta que la sensibilidad del método inmunocromatográfico es menor que el de las pruebas por el método ELISA (39).

### **1.2.3 Casos graves de dengue y marcadores de gravedad**

La incidencia de casos graves de dengue es relativamente rara, con un porcentaje inferior al 1% de todas las infecciones (52), aunque este porcentaje puede variar de acuerdo con la situación epidemiológica y al nivel de subregistro en cada país.

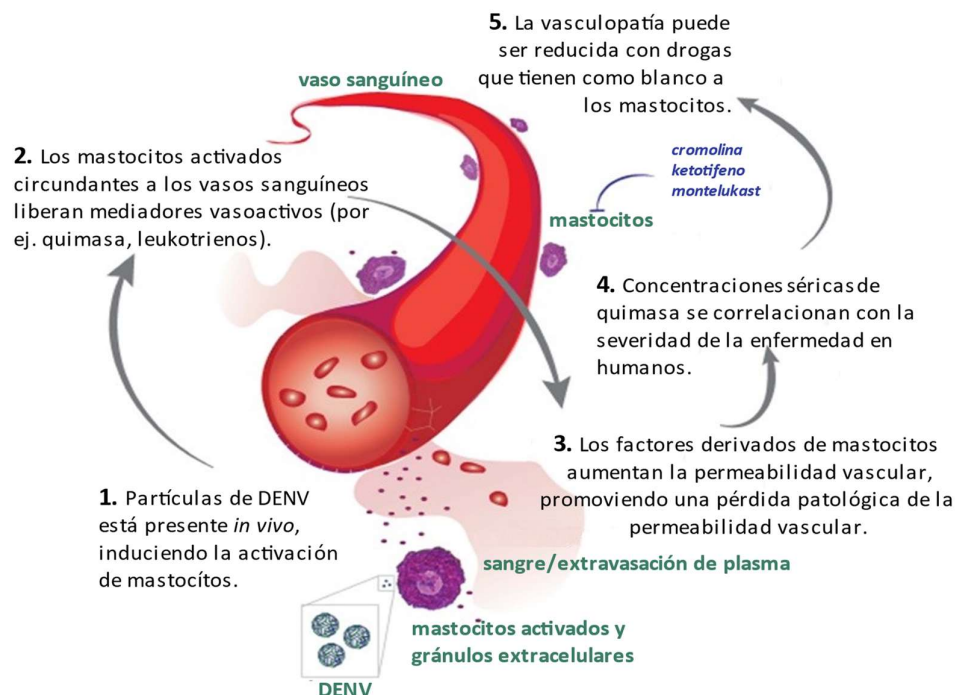
La patogénesis de la infección por DENV y las manifestaciones graves son cuestiones complejas. Diversos estudios indican que varios factores están relacionados, unos provenientes del huésped y otros del virus, como la inmunidad previa, la carga viral, los niveles de antígeno NS1, anticuerpos anti-NS1, el tipo y genotipo de DENV, factores genéticos del huésped, pero la naturaleza de estas interacciones sigue siendo poco clara (53).

La infección secundaria es el factor de riesgo mayormente reconocido para el desarrollo de formas graves, aunque aún no es posible diferenciar las infecciones primarias de las secundarias en los primeros días de la enfermedad a través de una técnica confiable y sencilla. La relación de las infecciones secundarias con los casos graves se explica por el mecanismo de respuesta exacerbada dependiente de anticuerpos (ADE, *antibody-dependent enhancement*) (54) según el cual los anticuerpos neutralizantes a baja concentración se unen al DENV y, en vez de neutralizarlo y evitar la infección, facilitan su entrada a las células blanco como monocitos, macrófagos y células dendríticas debido al reconocimiento de los receptores Fc expresados en las mencionadas células. De esta forma el virus logra ingresar a las células más eficientemente que en una infección primaria, dando lugar a una mayor cantidad de células infectadas. Esta teoría se utiliza para explicar también los casos graves en infantes con una infección primaria que nacieron de madres inmunizadas (55,56).

Se ha observado en pacientes más graves una mayor producción de citoquinas y mediadores vasoactivos que activan otras células y, finalmente cantidad

descontrolada de citoquinas, la “tormenta de citoquinas”, alterando la permeabilidad vascular. Las infecciones secundarias se han propuesto como un factor de riesgo para este fenómeno. Otra teoría explica que en la infección por DENV ocurre la translocación microbiana a nivel de la barrera intestinal, dando lugar a la circulación en el torrente sanguíneo de componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), un potente inmunógeno proveniente de las bacterias Gram negativas que conforman la microbiota intestinal (57,58). Varios estudios hallaron niveles elevados de LPS y de la proteína transportadora de LPS (LBP) en pacientes con dengue respecto a controles sanos y también en pacientes con cuadros más graves de dengue respecto a aquellos más leves, lo que podría indicar una utilidad como marcador de gravedad (57,59,60). Esto sugiere que, a parte del ADE, la tormenta de citoquinas también podría estar causada debido a la elevación del LPS en plasma y tal vez la de otros patrones moleculares bacterianos.

El rol de los mastocitos se conoce principalmente en alergias e infecciones parasitarias, pero se ha visto que la desgranulación de estas células ocurre también en infección por DENV en mastocitos humanos *in vitro* y en ratones (37–39). Se cree que ocurre por dos posibles mecanismos, infección de mastocitos por el virus o por interacción de las células con complejos anticuerpo-NS1. Esto produce la liberación de diferentes mediadores inflamatorios como histamina,  $\beta$ -hexosaminidasa, factor de necrosis tumoral (TNF) y la serinproteasa quimasa (CMA-1) (62). Un número creciente de investigaciones demuestra que CMA-1 es capaz de predecir casos graves y fatales de dengue en la fase aguda de la infección (se eleva entre los días 3 y 6 de enfermedad) (61), y que es capaz de alterar la permeabilidad vascular y causar extravasación de líquidos (62)(62)(62). También se ha estudiado la relación entre otros mediadores de los mastocitos y el dengue, como la inmunoglobulina E (IgE) y la histamina, hallándose asociación entre niveles elevados de estos mediadores en plasma de pacientes y la gravedad del dengue (63,64). Según estos datos, es indiscutible el rol de los mastocitos en la patogenia del dengue. La **Figura 1.4** esquematiza el rol del CMA-1 en la patogenia y su potencial como blanco terapéutico.



**Figura 1.4.** Esquema que representa el impacto de la desgranulación de mastocitos y CMA-1 sobre la permeabilidad vascular. Adaptado de St John y col., 2013 (62)

### 1.3 Epidemiología del dengue

El dengue circula durante todo el año en zonas tropicales y subtropicales en correlación con la temperatura ambiental, la temporada de lluvias y la fluctuación vectorial con la estacionalidad (65). La presencia del DENV en más de 100 países endémicos y la incidencia, que ha crecido 30 veces en los últimos 50 años (66), obedece a varios factores como la deforestación, la urbanización no planificada, el mayor desplazamiento humano, la ausencia de tratamientos específicos y de programas de vacunación (67).

#### 1.3.1 Dengue en las Américas

Los cuatro tipos de DENV circulan en las Américas desde el año 1963. Los países de América Latina con mayor incidencia por cada 100.000 habitantes, según datos obtenidos hasta el 2013, son Paraguay, República Dominicana, Colombia, Venezuela, Panamá, Surinam, Guayana Francesa, Nicaragua y Honduras (3) (**Figura 1.5**). Según los reportes de los Ministerios de Salud de las Américas, entre los años

2018 y 2020 se notificaron 6.028.561 de casos sospechosos, de los cuales 2.636.769 fueron confirmados con 37.643 casos graves y 3.125 fallecidos. En este periodo se vio una incidencia de casos graves de 1,4%. La mayor parte de los casos ocurrió en el 2019, con 3.167.542 casos sospechosos, 1.415.658 confirmados, 28.413 casos graves y 1.766 fallecidos con circulación de los cuatro tipos de DENV (52).



**Figura 1.5.** Incidencia de dengue por cada 100.000 habitantes. Modificado de Shepard y col., 2016 (68).

### 1.3.2 Dengue en Paraguay

El DENV se registró por primera vez en Paraguay en 1989 con una epidemia por DENV-1 que generó 41.000 casos sospechosos y una incidencia de 997 casos por cada 100.000 habitantes (52). Luego de 10 años sin actividad del virus, en 1999 inicia una epidemia nuevamente por DENV-1, aunque de menor magnitud, con 25.445 casos sospechosos notificados. A partir de este momento se mantienen reportes sostenidos de la enfermedad con el ingreso del DENV-2 en el año 2001 y del DENV-3 al año siguiente (52). La circulación del virus se sigue observando sin interrupción durante los siguientes años y en el 2007 se registran los primeros casos de dengue grave, que

ascendieron a 77. Se registraron 17 óbitos, siendo responsable de esta epidemia el DENV-3. En el 2012 ingresa el DENV-4 para mantenerse en circulación con el DENV-2 y DENV-1 en los siguientes años. En el 2013 se da la epidemia de dengue más mortífera del país con 144.470 casos sospechosos reportados, 2.076 casos de dengue grave y 255 fallecidos. En los años 2018 y 2019 se reportaron 44.170 casos sospechosos y 24 fallecidos (52). Y es en el 2020 cuando los números de casos sospechosos baten un récord, llegando a 223.615. Los casos graves en esta ocasión fueron mejor controlados y ascendieron a 167, mientras que el número de óbitos fue de 75 (52). En el 2018 se registró circulación predominante de DENV-1, en el 2019 y 2020 predominó el DENV-4 (52,69).

Suelen registrarse casos en todos los departamentos del país, aunque la procedencia principal de los pacientes de dengue históricamente corresponde al Departamento Central y Asunción, debido probablemente a la gran densidad poblacional en estas zonas.

#### **1.4 Justificación**

Los resultados obtenidos de este estudio aportarán datos acerca de las características de los pacientes sospechosos y confirmados en el periodo 2018-2020. Este periodo es de especial interés debido a que a fines de 2019 e inicios de 2020 se dio la epidemia de dengue más grande del Paraguay. Los datos permitirán conocer un poco más el perfil clínico de los pacientes con dengue y detectar características clínicas más frecuentemente relacionados a los casos de dengue leves y graves.

El estudio de marcadores de gravedad en pacientes con dengue es importante por las siguientes razones.

En primer lugar, detectar moléculas que puedan servir para mejorar el manejo de pacientes y disminuir los casos graves y mortales. Los síntomas clínicos iniciales del dengue no pueden distinguir entre cuadros leves y graves de la enfermedad, y los signos de alarma solo pueden desarrollarse con el tiempo a medida que la enfermedad progresa (14), lo que implica un desafío para intervenciones efectivas en el paciente. Se ha demostrado que la detección temprana de dengue y el subsecuente tratamiento oportuno, disminuye los casos mortales de 10% a 1% entre los casos graves (70,71). Por lo tanto, hay una necesidad de estudiar marcadores para identificar a los pacientes que son más propensos a desarrollar cuadros graves, permitiendo así una priorización de los recursos para los pacientes que más lo necesitan, y también disminuir las internaciones innecesarias, sobre todo en escenarios epidémicos, que son constantes en nuestro país (72,73). Con este estudio se busca identificar candidatos a marcadores de gravedad del dengue, que deben ser estudiados posteriormente con mayor profundidad para evaluar la posibilidad de emplearse como predictores.

En segundo lugar, el estudio de posibles marcadores de gravedad permite contribuir al conocimiento sobre la compleja fisiopatología del dengue, sobre todo tratándose de una población de la que se cuenta con pocos datos sobre esto. El mejor conocimiento de la fisiopatología del dengue puede aportar información de relevancia en lo que respecta al desarrollo de antivirales y vacunas contra el dengue.

## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar infecciones por el virus del dengue en pacientes con sospecha clínica y evaluar marcadores de gravedad de dengue, Paraguay (2018-2020).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar clínica y demográficamente a los pacientes.
2. Determinar la presencia de la proteína NS1 de DENV, anticuerpos tipo IgM e IgG anti-DENV mediante ensayos inmunocromatográfico y ELISA en muestras de pacientes con cuadro sospechoso de dengue.
3. Detectar, tipificar y cuantificar presencia de ARN del DENV en muestras de pacientes con cuadro sospechoso de dengue.
4. Cuantificar LBP y CMA-1 en muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de dengue.
5. Comparar las variables entre los pacientes que han desarrollado dengue sin signos de alarma, con signos de alarma y dengue grave.

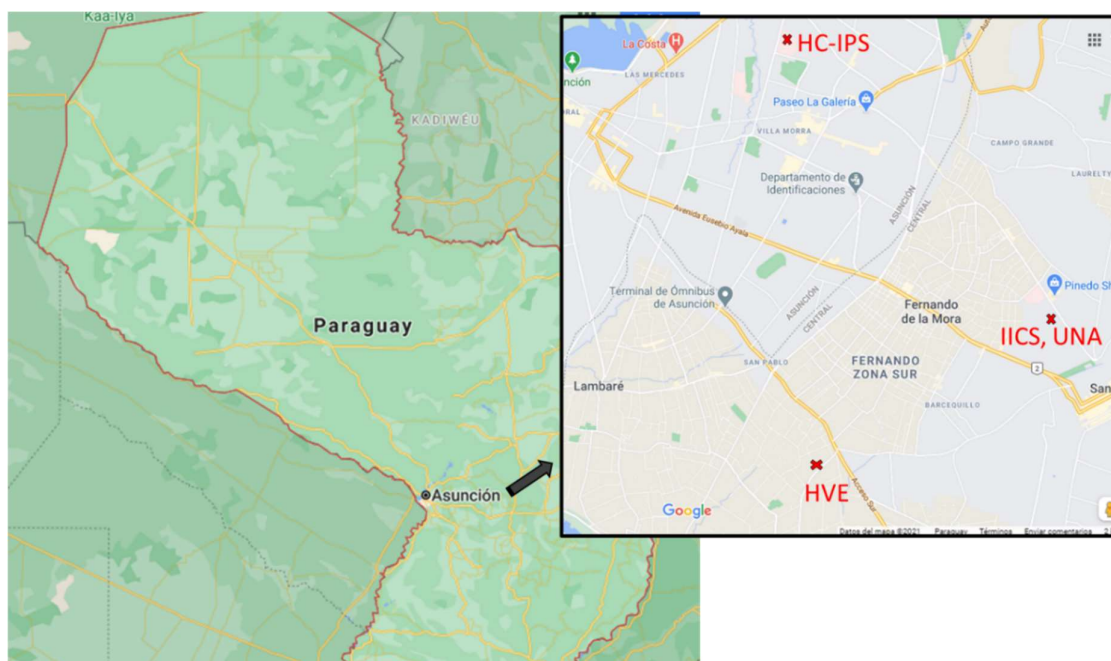
## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Diseño y población de estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con muestreo no probabilístico por conveniencia.

Fueron incluidos 1.490 pacientes de ambos sexos de 0 a 91 años que presentaron cuadro sospechoso de dengue de hasta 8 días de evolución, que aceptaron participar del estudio y que concurrieron a cualquiera de los siguientes tres sitios (**Figura 3.1**):

- a. Hospital Distrital de Villa Elisa (HVE), ubicado en la ciudad de Villa Elisa, de enero a marzo de 2018.
- b. Servicios de urgencias y emergencias del Hospital Central de Instituto de Previsión Social (HC-IPS), ubicado en la ciudad de Asunción, durante los años 2019 y 2020.
- c. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS, UNA), ubicado en la ciudad de San Lorenzo, durante los años 2018 al 2020.



**Figura 3.1.** Ubicación de los puntos de muestreo de pacientes (<https://www.google.com/maps>)



Las muestras del HVE del período mencionado y las muestras del IICS, UNA del 2018 son provenientes de la Seroteca del Departamento de Producción del IICS, UNA que fueron colectadas bajo los mismos criterios de inclusión dentro del Proyecto “Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Dpto. Central, Paraguay”.

El cuadro sospechoso de dengue se definió por la presencia de dos o más síntomas:

1. Fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$
2. Ojos rojos o conjuntivitis
3. *Rash*/Exantema
4. Dolor muscular difuso/en todo el cuerpo
5. Dolor articular en más de una articulación

Se excluyeron los pacientes con aparente foco de infección por otras causas como neumonía, infección urinaria, celulitis o enfermedad gastrointestinal. Esta información fue obtenida durante la entrevista con los pacientes o a través de las historias clínicas del Hospital.

### **3.1.1 Reclutamiento**

El reclutamiento de pacientes se realizó en el marco del Proyecto “Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Dpto. Central, Paraguay” cuyo protocolo fue aprobado por el *Institutional Review Board* de la Universidad de Emory (código IRB00097089, 27/06/2017).

En el HC-IPS, los potenciales participantes fueron identificados durante su visita al Laboratorio de Urgencias (pacientes ambulatorios). La localización de los pacientes internados por sospecha de dengue o dengue confirmado se realizó a través del Departamento de Epidemiología.

La participación en este estudio no implicó tomas de muestra adicionales para los pacientes, ya que se tomaron cuando hubo indicación de análisis laboratoriales por

parte del médico tratante. Las muestras de pacientes internados fueron colectadas de las serotecas de los laboratorios de Urgencias y Emergencias, luego de ser procesadas y cuando ya no tuvieran otro uso.

En el IICS, UNA, fueron reclutados los pacientes con sospecha de dengue con la solicitud del estudio de antígeno NS1 de DENV.

Estos pacientes tuvieron un seguimiento que, en el caso de aquellos del HC-IPS, se realizó a través del Departamento de Epidemiología del mencionado Hospital, donde se lleva un registro de todos los pacientes internados y su alta, traslado o deceso. En el caso de los pacientes de HVE se obtuvo una planilla con los registros de pacientes internados y su evolución. Y en cuanto a los que concurrieron al IICS, UNA este seguimiento se dio por contacto telefónico con los pacientes y por una nueva visita que se solicitó a los pacientes en el periodo convaleciente de la enfermedad (15-20 días después de desarrollado el cuadro agudo). Todas las muestras colectadas fueron transportadas en frío lo más rápido posible al laboratorio del IICS, UNA para su codificación, fraccionamiento y posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

El fraccionamiento se realizó de acuerdo con la cantidad de muestra de cada paciente, de 1 a 8 alícuotas (1 de ellas exclusiva para la extracción del ARN viral y 3 alícuotas para el estudio de marcadores, entre otras).

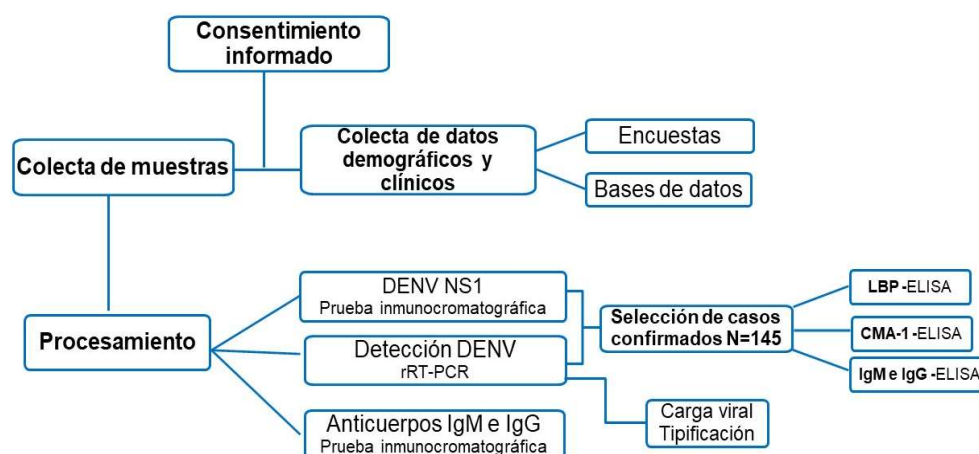
### **3.1.2 Muestras**

Fueron incluidas muestras de suero o plasma (con EDTA o heparina) conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las pruebas inmunocromatográficas, ELISA, y rRT-PCR fueron llevadas a cabo en los laboratorios de los Departamentos de Salud Pública y de Producción del IICS, UNA.

### **3.2 Mediciones**

A todos los pacientes incluidos se les realizó una encuesta en la que se colectaron datos demográficos y clínicos. Las muestras de pacientes con sospecha de dengue fueron analizadas para la detección del genoma viral de DENV por rRT-PCR, antígeno NS1 y anticuerpos anti-DENV por pruebas rápidas. Las muestras positivas para genoma viral de DENV fueron tipificadas y se determinó la carga viral. Del total

de muestras confirmadas de dengue se seleccionaron 145, según la gravedad del cuadro desarrollado, para el estudio de los niveles de LBP, CMA-1 y anticuerpos IgM e IgG por el método de ELISA (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Esquema general de trabajo

### 3.2.1 Encuestas

Las encuestas (**Anexo 1**) fueron realizadas a través de la aplicación *KoboToolbox* (<https://www.kobotoolbox.org/>), que genera una base de datos de todas las encuestas realizadas, descargados en formato Excel para su análisis.

### 3.2.2 Parámetros laboratoriales

Si estaban disponibles, los resultados de análisis clínicos realizados de rutina durante la atención de los pacientes fueron copiados y luego cargados a planillas Excel por código. Los parámetros registrados se citan a continuación:

- a) **Hemograma:** glóbulos rojos, glóbulos blancos, fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas, índices hematimétricos
- b) **Coagulograma:** TTPA, Tiempo de protrombina, fibrinógeno
- c) **Química:** electrolitos, hierro, calcio, magnesio, perfil lipídico, perfil hepático, perfil renal, gamma GT, troponina, perfil lipídico, proteína C reactiva.

### 3.2.3 Detección de antígeno NS1 de DENV

Se realizó la determinación del antígeno NS1 en 794 muestras de suero o

plasma a través de pruebas rápidas inmunocromatográficas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Standard SD, Corea) en el IICS-UNA.

Como no se contaba con suficiente volumen de muestras para realizar la determinación, 474 resultados de antigenemia NS1 (East Mark, China y otras marcas) de pacientes atendidos en el IPS-HC fueron obtenidos en formato digital de los Laboratorios de Urgencias y Emergencias.

### **3.2.4 Detección de anticuerpos IgM e IgG anti-DENV**

Se utilizaron pruebas rápidas inmunocromatográficas (Standard SD, Corea) para la detección cualitativa de anticuerpos IgM e IgG anti-DENV en muestras de suero y/o plasma en 801 muestras. Se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **3.2.5 Detección de genoma de DENV por rRT-PCR**

Previo a la reacción de rRT-PCR se realizó la extracción del ARN viral a partir de 140 uL de suero o plasma utilizando el kit *Qiaamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Germantown, MD, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución de ARN se realizó en 60 uL de buffer de elución.

Las muestras fueron testadas para los virus ZIKV, chikungunya (CHIKV) y DENV simultáneamente, utilizando el método descrito previamente por Waggoner y col., 2016 e implementado en el laboratorio por Cantero y col., 2019 (74,75).

Se utilizaron cebadores y sondas dirigidas contra la región no codificante 5'UTR, altamente conservada en los 4 tipos de DENV. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 uL conteniendo: 12,5 uL del reactivo 2X *Reaction Mix* (0,4 mM de cada dNTP, 6 mM de MgSO<sub>4</sub>), 0,5 uL de las enzimas retrotranscriptasa y ADN polimerasa (SuperScript™ III RT/Platinum® TaqMix, Invitrogen, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), 2 uL de la mezcla de cebadores y sondas TaqMan®, 5 uL de agua libre de nucleasas y 5 uL de ARN purificado.

Fueron utilizados como controles ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) sintético y aislados virales de DENV, ZIKV y CHIKV (donados por la Universidad de Emory) como controles positivos; agua libre de nucleasas como control negativo. Las secuencias de los cebadores y sondas utilizadas se encuentran en

la sección de **Anexo 3**. En las muestras negativas para la reacción de ZCD se realizó como control interno la detección del gen de la RNAsaP. Esta es una endonucleasa (76) cuya detección indica presencia de material genético humano en la muestra y sirve para evaluar la extracción y la ausencia de inhibidores de la reacción, con el fin de evitar falsos negativos. El protocolo utilizado fue el descrito por Waggoner y col., 2013 (77) y las secuencias de los cebadores y sondas se encuentran en la sección de **Anexo 3**. En este caso la mezcla de reacción tuvo la misma composición que la mencionada más arriba, con la diferencia de que se agregó 1 uL de la mezcla de sondas y cebadores y se disminuyó el volumen de agua a 4 uL.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) con el siguiente programa de ciclado: 52°C durante 15 minutos, 94°C durante 2 minutos y 45 ciclos de 94°C durante 15 segundos, luego 55°C durante 40 segundos y 68°C durante 20 segundos.

El umbral o *threshold* se fijó en 0,05 en el canal verde para DENV; 0,1 en el canal carmesí para ZIKV; 0,1 en el canal naranja para CHIKV y 0,1 en el canal amarillo para RNAsaP. En muestras negativas para DENV, RNAsaP se consideró positiva si la curva cruzaba el mencionado umbral en cualquier ciclo. En cuanto a la detección de los virus, la reacción se consideró positiva si la curva de amplificación cruzaba el umbral antes del ciclo 40 (Ct). Las muestras con curvas más tardías fueron evaluadas individualmente.

Se analizaron en total 1.021 muestras.

### **3.2.6 Tipificación de DENV y determinación de carga viral**

Las muestras positivas para la detección de ARN de DENV fueron sometidas a la reacción de tipificación y determinación de carga viral (expresado como log<sub>10</sub> copias/mL de suero) utilizando el protocolo validado por Waggoner y cols., 2013 (78) que amplifica secuencias de las regiones 5'UTR y cápside de los cuatro tipos de DENV. El volumen de reacción fue de 25 uL con 12,5 uL del reactivo 2X *Reaction Mix* (0,4 mM de cada dNTP, 6 mM de MgSO<sub>4</sub>), 0,5 uL de las enzimas retrotranscriptasa y ADN polimerasa (SuperScript™ III RT/Platinum® TaqMix, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 2 uL de la mezcla de cebadores y sondas TaqMan® para los 4 tipos de DENV, 5 uL de agua libre de nucleasas y 5 uL

de ARN purificado.

Las secuencias de los cebadores y sondas se encuentran en la sección de **Anexo 3**.

Fueron utilizados como controles positivos ADNc sintético y aislados virales de DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 y agua libre de nucleasas (*Life Technologies* Carlsbad, CA) como control negativo.

La reacción fue llevada a cabo en termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Valencia, CA, EUA) con las siguientes condiciones de ciclado: 52°C por 15 minutos, 94°C por 2 minutos, 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos y 68° por 40 segundos. Los canales utilizados fueron el verde (DENV-1), amarillo (DENV-2), naranja (DENV-3) y rojo (DENV-4), para los que se determinaron los umbrales de 0,05 para los dos primeros y 0,025 para los dos últimos. Se consideraron positivas las curvas que cruzaran este umbral antes del ciclo 40.

### **3.2.7 Criterio de confirmación de casos de dengue**

Fueron considerados como casos positivos de dengue todos los pacientes cuyas muestras dieran resultado positivo para la reacción de detección de ARN de DENV por rRT-PCR y/o para la detección de antígeno NS1 por la prueba inmunocromatográfica. Siguiendo este criterio se confirmaron 508 casos de dengue.

### **3.2.8 Clasificación de casos de dengue de acuerdo con los criterios de la OMS, 2009**

De los 508 pacientes con dengue confirmado, fueron seleccionadas 145. Esta selección se realizó de acuerdo con los siguientes criterios:

- volumen suficiente de muestra y conservación apropiada,
- disponibilidad de reactivos,
- disponibilidad de datos del paciente e información suficiente sobre el cuadro desarrollado, siendo este el criterio de mayor relevancia.

Fueron excluidos los pacientes de los cuales no se tuvo seguimiento, a fin de evitar la clasificación errónea en los grupos mencionados.

Estos 145 pacientes se clasificaron según los criterios de la OMS, 2009 (**Tabla**

**1.1)** en los grupos DSSA, DCSA y DG. Fue necesario cumplir un solo criterio para considerar los casos como DCSA o DG.

54 pacientes en los grupos de DSSA y DCSA fueron pareados en base a los siguientes criterios:

1. Sexo.
2. Edad: con un rango de  $\pm 5$  años.
3. Comorbilidad: se establecieron tres categorías: Hipertensión arterial (HTA), Diabetes mellitus (DM) y otras.
4. Días de síntomas: con un rango de  $\pm 1$  día.

El grupo DG no fue pareado debido a que no fue posible incluir casos de DCSA y DSSA que tuvieran toda la información necesaria para ser clasificados.

La clasificación se realizó a través de la información colectada en las encuestas de los pacientes en primera instancia. Luego fueron consultadas las historias clínicas (que incluyen también estudios y análisis laboratoriales realizados), cierres de casos asociados a dengue, actas de defunción y fichas epidemiológicas cuando estuvieron disponibles, además de llamadas telefónicas a los pacientes según necesidad.

La revisión de los datos clínicos de los pacientes de HC-IPS fue realizada con el apoyo del plantel médico del Departamento de Epidemiología del HC-IPS. En HVE se tuvo apoyo del servicio de atención de Urgencias.

En estas muestras seleccionadas se determinaron las concentraciones de CMA-1, LBP y de anticuerpos por el método de ELISA. Finalmente, se realizaron comparaciones de los resultados obtenidos entre los tres grupos de pacientes.

### **3.2.9 Detección del índice anticuerpos IgG e IgM anti-DENV**

Se determinó el índice de anticuerpos IgG e IgM anti-DENV utilizando kits ELISA comerciales (Dengue ELISA IgM de Captura M1018 y Dengue ELISA IgG G1018, Vircell *Microbiologists*, Granada, España) a partir de 5 uL de suero o plasma siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estas determinaciones fueron realizadas en los 145 pacientes confirmados de dengue.

La detección de IgM está basada en la captura de los anticuerpos específicos contra DENV en la muestra a través de su unión con anticuerpos anti-IgM humano adsorbidos en la superficie de poliestireno. Así, los anticuerpos capturados luego reaccionan con antígeno de DENV conjugados con peroxidasa. Por otro lado, la detección de IgG específica anti-DENV ocurre a través de su unión a antígenos de DENV adsorbidos en la superficie de poliestireno.

En el paso final de ambas determinaciones se leyó la absorbancia a 450/620 nm después de agregar tetrametilbencidina, para lo cual se utilizó el lector de ELISA Inc. Stat Fax 2100 (Awareness *Technology*, Florida, EE. UU.).

Se utilizaron cuatro controles en cada corrida (proveídos por el fabricante): uno negativo, otro positivo, y dos controles de corte.

La concentración se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de anticuerpos} = \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Promedio de absorbancia de los controles de corte}} \right) * 10$$

La sensibilidad y especificidad declaradas por el fabricante para la detección de IgM son de 98% y 98-99%, respectivamente, y para IgG de 98% y 100%, respectivamente.

### 3.2.10 Determinación de CMA-1

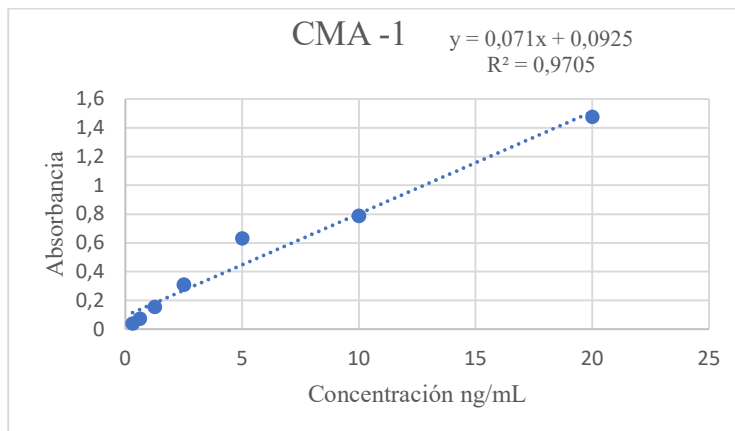
Se determinó la concentración de CMA-1 utilizando kits ELISA comerciales (*G-Biosciences, St. Louis, MO, EE. UU.*) en muestras de suero o plasma diluidas dos veces de los 145 pacientes confirmados para dengue, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este ensayo se basa en la captura de la proteína CMA-1 por anticuerpos específicos adsorbidos en los pocillos de la placa de ELISA. En el paso final se leyó la absorbancia a 450 nm después de agregar tetrametilbencidina utilizando el lector de ELISA Inc. Stat Fax 2100 (Awareness *Technology*, Florida, EE. UU.).

Se utilizó buffer diluyente de muestras como control negativo y dilución 1:4 de estándar (CMA-1 recombinante) como control positivo. Se elaboró una curva de calibración (**Figura 3.3**) con mediciones realizadas por duplicado para obtener la ecuación de la recta y extrapolar las absorbancias obtenidas con la concentración de



CMA-1 en la muestra. Este valor se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración final (x2). La sensibilidad del kit declarada por el fabricante es de 0,188 ng/mL.



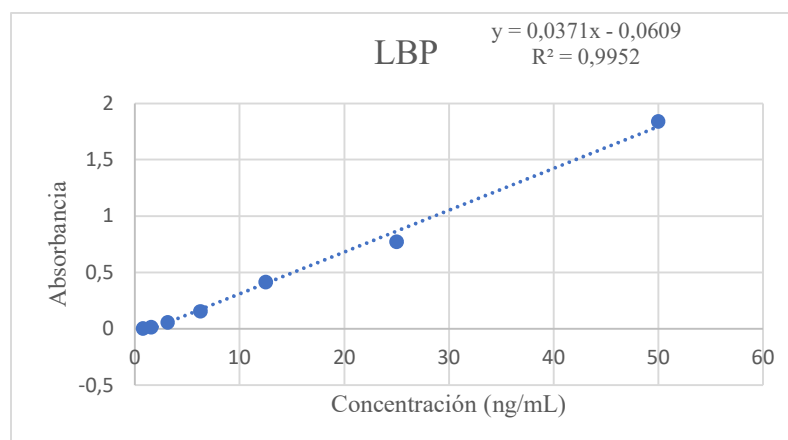
**Figura 3.3.** Curva de calibración para CMA-1.

### 3.2.11 Determinación de LBP

En los 145 pacientes confirmados para dengue previamente seleccionados se determinó la concentración de LBP utilizando kits ELISA comerciales (Picokine Boster, Pleasanton, CA) en muestras de suero o plasma diluidas mil veces siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este ensayo se basa en la captura de la proteína LBP por parte de anticuerpos específicos absorbidos en la superficie de los pocillos de la placa de ELISA. En el paso final se leyó la absorbancia a 450 nm después de agregar tetrametilbencidina utilizando el lector de ELISA Inc. Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Florida, EE. UU.).

Se elaboró una curva de calibración (**Figura 3.4**) con mediciones realizadas por duplicado para obtener la ecuación de la recta y extrapolar las absorbancias obtenidas con la concentración de LBP en la muestra. Este valor se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración final (x1000). La sensibilidad del kit es inferior a 50 pg/ml según el fabricante.



**Figura 3.4.** Curva de calibración para LBP.

Se incluyeron las mediciones de LBP en un grupo control (CS) de individuos paraguayos aparentemente sanos, cuyas muestras fueron tomadas en el marco del proyecto “Estudio de las proteínas CD14 soluble y proteína de unión a lipopolisacárido en la enfermedad celíaca”. En el momento de la toma de muestra los pacientes firmaron un consentimiento informado y mediante cuestionario refirieron no presentar enfermedad, así como tampoco consumo de medicamentos.

### 3.3 Análisis estadísticos

Toda la información fue colectada y recopilada en hojas de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA). Los resultados descriptivos de las variables categóricas se mostraron por frecuencias y porcentajes. Se utilizaron promedios y medianas para las variables continuas. Las comparaciones entre grupos de pacientes de las medias y medianas se realizaron por las pruebas de ANOVA y Kruskal Wallis, respectivamente. Para esta comparación se realizó previamente un análisis de *outliers* por el método Rout ( $Q=1$ ). La comparación de medianas entre dos grupos se realizó con la prueba de Mann-Whitney y para la comparación de medias, la prueba de T Student para muestras no pareadas. Las relaciones entre variables cuantitativas se calcularon mediante correlación de Spearman. Para las comparaciones de múltiples grupos se realizó la prueba de ANOVA junto con la de Tukey en el caso de las variables paramétricas, y para las no paramétricas se realizó la prueba de Kruskal Wallis con el análisis de Dunn. La significancia estadística se consideró con una  $p < 0,05$  para todos los análisis. Todos los cálculos estadísticos y los gráficos se realizaron con el programa *GraphPad Prism* versión 9 (GraphPad, San Diego, CA).

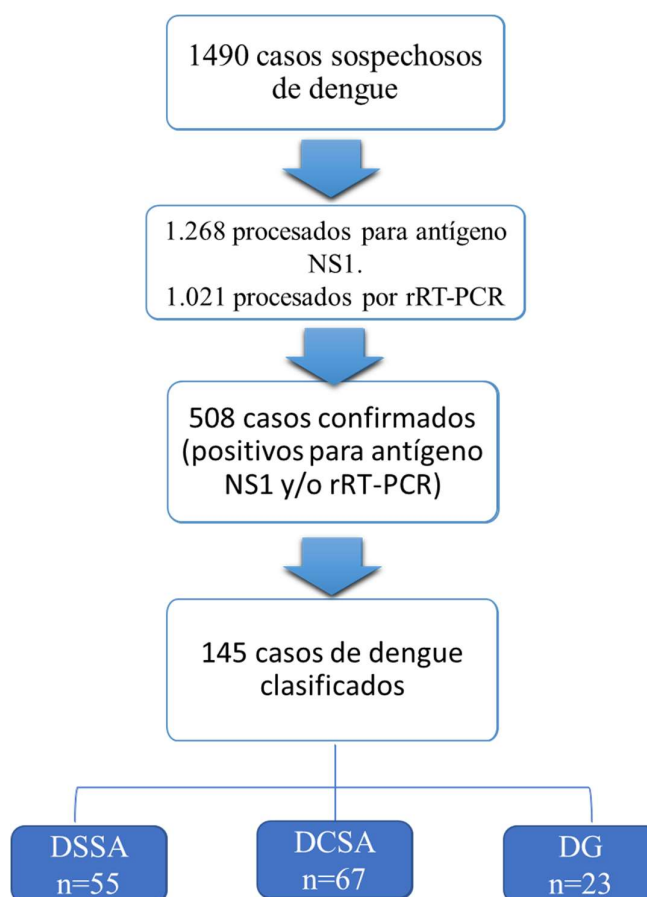
### 3.4 Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por los Comités Científico y Ético del IICS – UNA, con código de aprobación P16/2019. A todos aquellos que cumplían con los criterios de inclusión se les explicó sobre el proyecto de investigación y se les preguntó si deseaban participar. En caso de obtener una respuesta positiva, se les solicitó un consentimiento informado (**Anexo 2.1**) y además un asentimiento en el caso los menores de edad de entre 6 a 18 años (**Anexo 2.2**), para luego realizar una encuesta. Cuando no fue posible obtener el consentimiento informado en los puntos de reclutamiento, se llamó telefónicamente a los pacientes para solicitar el consentimiento verbal (**Anexos 2.3**). Todas las muestras fueron codificadas y las identidades de las pacientes resguardadas.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### 4.1 Pacientes con cuadro sospechoso de dengue

En total 1.579 pacientes acudieron a HVE, HC-IPS y al IICS, UNA y participaron del Proyecto Marco entre los años 2018 al 2020. De ellos, 1.490 cumplieron los criterios de inclusión. Las muestras de pacientes reclutados en el 2018 (enero a marzo) provinieron de HVE y del IICS, UNA y ya se encontraban en la seroteca del Departamento de Producción en el momento del inicio de este trabajo de tesis. En la **Figura 4.1** se observa un resumen del número de muestras incluidas en cada fase de este estudio.



**Figura 4.1.** Flujo de muestras incluidas en cada etapa de trabajo. DSSA: dengue sin signos de alarma; DCSA: dengue con signos de alarma; DG: dengue grave.

El reclutamiento de pacientes fue realizado mayormente en el HC-IPS, donde se colectó el 80% de las muestras de marzo a diciembre del 2019 y de enero a inicios

de marzo del 2020. 5% (76/1.490) correspondió a pacientes que acudieron al IICS, UNA voluntariamente para participar del Proyecto Marco en los años 2018, 2019 y de enero a marzo de 2020.

Considerando por año, se incluyeron 227 muestras del año 2018 (227/1.490; 15%), 665 del 2019 (665/1.490; 45%), y 598 muestras del 2020 (598/1.490; 40%).

#### **4.1.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes con sospecha de dengue**

Del total de pacientes con sospecha de dengue reclutados entre los años 2018 a 2020, 60,1% (895/1490) fueron mujeres. 18% de las pacientes mujeres en el HC-IPS eran gestantes.

Los pacientes tuvieron de 0 a 91 años, con una mediana de 28 años. La distribución de frecuencias por rangos de edades se muestra en la **Tabla 4.1**. Siendo el rango etario más frecuente el de 16 a 30 años.

**Tabla 4.1.** Distribución de frecuencias de edades de pacientes con sospecha de dengue.

| <b>Rangos de edades (años)</b> | <b>Frecuencia absoluta</b> | <b>Frecuencia relativa</b> |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 – 15                         | 321                        | 21,5%                      |
| 16-30                          | 499                        | 33,4%                      |
| 31-45                          | 337                        | 22,6%                      |
| 46-60                          | 175                        | 11,7%                      |
| 61-75                          | 107                        | 7,2%                       |
| 76-91                          | 51                         | 3,4%                       |
| <b>Total</b>                   | <b>1.490</b>               | <b>100%</b>                |

Los pacientes provinieron principalmente del Departamento Central y Capital, como se observa en la **Tabla 4.2**. El centro de mayor atención a pacientes provenientes de diferentes puntos de todo el país fue el HC-IPS, donde se reclutaron pacientes de 15 de los 17 departamentos (no se reclutaron pacientes de dos departamentos: Misiones y Ñeembucú). Dentro del Departamento Central, la procedencia correspondió mayoritariamente a las ciudades de Villa Elisa (142/1.068; 13%) Luque (134/1.068; 13%), San Lorenzo (119/1.068; 11%), Ñemby (114/1.068; 11%), Limpio (88/1.068;8%) y Capiatá (76/1.068; 7%) (Tabla **Anexo 4**).

**Tabla 4.2.** Distribución de procedencia por departamento de pacientes con sospecha de dengue.

| Departamento     | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Central          | 1.068               | 71,7%               |
| Capital          | 300                 | 20,1%               |
| Cordillera       | 32                  | 2,2%                |
| Paraguarí        | 17                  | 1,1%                |
| Presidente Hayes | 17                  | 1,1%                |
| San Pedro        | 13                  | 0,9%                |
| Amambay          | 8                   | 0,5%                |
| Alto Paraná      | 6                   | 0,4%                |
| Canindeyú        | 6                   | 0,4%                |
| Caaguazú         | 5                   | 0,3%                |
| Concepción       | 5                   | 0,3%                |
| Guairá           | 5                   | 0,3%                |
| Boquerón         | 3                   | 0,2%                |
| Alto Paraguay    | 1                   | 0,1%                |
| Caazapá          | 1                   | 0,1%                |
| Itapúa           | 1                   | 0,1%                |
| Sin datos        | 2                   | 0,1%                |
| Total            | 1.490               | 100,0%              |

El 59% (895/1.490) de los pacientes fueron ambulatorios y 41% (607/1.490) internados.

Con respecto a las manifestaciones clínicas referidas por los pacientes en las encuestas, fichas epidemiológicas e historias clínicas, se registró una amplia variedad de signos y síntomas inespecíficos (**Tabla 4.3**). El 92% (1.372/1.490) reportó fiebre, siendo este el signo más común, seguido de cefalea con un 79% (1.121/1.490), mialgia 75% (1.014/1.490) y artralgia con 68% (1.121/1.490). El sangrado se presentó en 11% (154/1.490) de los casos siendo la nariz, encías y vagina los sitios más frecuentes de hemorragias. Menos frecuentemente se reportó hemorragias al vomitar, al orinar y en oídos. Síntomas más graves como acumulación de líquidos, insuficiencia respiratoria, sangrado grave y alteraciones neurológicas fueron menos frecuentes y se colectaron a partir de las historias o fichas clínicas cuando estuvieron disponibles (**Tabla 4.3**).

**Tabla 4.3.** Datos clínicos de casos sospechosos y confirmados de dengue.

|                                                 | Sospechosos     | Confirmados   |
|-------------------------------------------------|-----------------|---------------|
| <b>Número de casos</b>                          | 1.490           | 508           |
| <b>Sitio clínico</b>                            |                 |               |
| <b>IPS-HC</b>                                   | 1.189 (80%)     | 334 (65%)     |
| <b>HVE</b>                                      | 225 (15%)       | 115 (22%)     |
| <b>IICS</b>                                     | 76 (5%)         | 59 (12%)      |
| <b>Sexo F/M</b>                                 | 895/594         | 284/224       |
| <b>Edad, promedio</b>                           | 31,7±19,9       | 35,6±19,8     |
| <b>Comorbilidades</b>                           | 385/1.274 (30%) | 122/378 (32%) |
| <b>Días de síntomas, promedio</b>               | 3,7 ±1,7        | 4 ±1,8        |
| <b>Signos y síntomas</b>                        |                 |               |
| <b>Fiebre</b>                                   | 1.372 (92%)     | 480 (95%)     |
| <b>Cefalea</b>                                  | 1.180 (79%)     | 424 (83%)     |
| <b>Mialgia</b>                                  | 1.121 (75%)     | 406 (84%)     |
| <b>Artralgia</b>                                | 1.014 (68%)     | 379 (78%)     |
| <b>Decaimiento</b>                              | 753 (51%)       | 278 (55%)     |
| <b>Náuseas</b>                                  | 636 (43%)       | 250 (50%)     |
| <b>Dolor retroocular</b>                        | 624 (42%)       | 227 (45%)     |
| <b>Conjuntivitis</b>                            | 481 (32%)       | 183 (37%)     |
| <b>Dolor de espalda (cerca de los pulmones)</b> | 529 (36%)       | 174 (34%)     |
| <b>Rash</b>                                     | 348 (23%)       | 123 (25%)     |
| <b>Dolor abdominal</b>                          | 526 (35%)       | 186 (37%)     |
| <b>Vómitos</b>                                  | 455 (31%)       | 138 (27%)     |
| <b>Sangrado</b>                                 | 157 (11%)       | 54 (11%)      |
| <i>Nariz</i>                                    | 56 (36%)        | 13 (24%)      |
| <i>Encías</i>                                   | 46 (29%)        | 16 (30%)      |
| <i>Vagina</i>                                   | 30 (19%)        | 11 (20%)      |
| <i>Heces</i>                                    | 9 (6%)          | 4 (7%)        |
| <i>Otros</i>                                    | 11 (7%)         | 7 (13%)       |
| <i>Sin datos</i>                                | 5 (3%)          | 3 (6%)        |
| <b>Tos</b>                                      | 291 (20%)       | 59 (14%)      |
| <b>Diarrea</b>                                  | 289 (19%)       | 103 (20%)     |
| <b>Dolor de garganta</b>                        | 272 (18%)       | 66 (13%)      |
| <b>Dificultad para respirar</b>                 | 289 (19%)       | 101 (19%)     |
| <b>Edema</b>                                    | 96 (6%)         | 36 (7%)       |

F: femenino. M: masculino.

Para la distribución de comorbilidades en los pacientes reclutados se consideró una n=1.274, debido a que no fue posible obtener este dato de todos los pacientes. Un 70% (889/1.274) manifestó no tener ninguna enfermedad de base en el momento del reclutamiento, mientras que entre los pacientes con comorbilidades, 52% padecía HTA

(199/385), 19% DM (73/385), 10% (37/385) enfermedades cardíacas, un 8% (31/385) padecía enfermedades autoinmunes, 6% (25/385) enfermedad renal crónica y 5% (19/385) cáncer. 33% (127/385) tenía otras enfermedades de base, como alergias, asma, síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), hipotiroidismo, trastornos epilépticos.

56% (215/385) de los pacientes con comorbilidades fue internado, mientras que un 41% (362/889) fue ambulatorio, detectándose una asociación entre el padecimiento de comorbilidades y la internación ( $p < 0,00001$ ).

54% (802/1.490) de los pacientes acudió a los puntos de reclutamiento hasta el tercer día de iniciados los síntomas. Con un mínimo de 1 y un máximo de 8, el promedio de días de síntomas fue de  $3,7 \pm 1,7$ .

#### 4.1.2 Detección de antígeno NS1, ARN de DENV y anticuerpos anti-DENV en pacientes con sospecha de dengue

En la **Tabla 4.3** se observan las características clínicas y demográficas de los pacientes con dengue. La mayoría fueron mujeres con un promedio de edad de  $35,6 \pm 19,8$  años. El 95% (480/508) presentó fiebre, cefalea, mialgias y artralgia como síntomas más frecuentes. El sangrado se observó principalmente en encías, nariz y vagina. El 32% (122/378) presentó comorbilidades y el 44% (225/508) requirió internación.

Se obtuvieron resultados de antígeno NS1 para 1.268 muestras. Como se observa en la **Tabla 4.4**. El 26% (330/1.268) de las muestras testeadas para antígeno NS1 fueron positivas, mientras que para la rRT-PCR 36% (365/1.021) de las muestras testeadas resultó positivo.

**Tabla 4.4.** Resultados de pruebas de dengue realizadas a los pacientes con sospecha de clínica.

| Resultado    | Determinaciones para dengue |              |            |            |
|--------------|-----------------------------|--------------|------------|------------|
|              | NS1                         | rRT-PCR      | IgM        | IgG        |
| Positivo     | 330 (26%)                   | 365 (36%)    | 123 (15%)  | 358 (45%)  |
| Negativo     | 938 (74%)                   | 657 (64%)    | 678 (85%)  | 443 (55%)  |
| <b>Total</b> | <b>1.268</b>                | <b>1.021</b> | <b>801</b> | <b>801</b> |



508 muestras fueron positivas para NS1 y/o rRT-PCR, que se consideran como casos confirmados de dengue para este estudio. 960 muestras se procesaron para ambas determinaciones, 187 fueron positivas por las dos técnicas y 156 fueron negativos para NS1 pero positivos por la técnica molecular.

De las 365 muestras positivas por rRT-PCR, se pudieron tipificar 331, según lo cual el 62% (206/331) fueron infecciones por DENV-4, 31% (102/331) por DENV-1 y 7% (23/331) por DENV-2.

#### 4.2 Selección de casos de dengue y clasificación según criterios OMS, 2009

De los 508 pacientes confirmados de dengue, fueron seleccionados 145 y clasificados en los grupos de DSSA, DCSA y DG, quedando distribuidos tal como se observa en la **Tabla 4.5**. 54 pacientes del grupo DSSA fueron pareados con otros 54 del grupo DCSA. También se incluyeron pacientes sin parrear, uno en el grupo DSSA y 13 del grupo DCSA.

**Tabla 4.5.** Grupos de pacientes de dengue clasificados según la guía OMS, 2009 y criterios utilizados para parrear los pacientes entre los grupos DCSA y DSSA (n=145).

|                                                          | <b>DSSA</b><br>n=55 (54 pareados) | <b>DCSA</b><br>n=67 (54 pareados) | <b>DG</b><br>n=23 |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| <b>Edad. Mediana (rango intercuartílico)</b>             | 26 (46-12)                        | 31 (48-20)                        | 67 (75-53)        |
| <b>Sexo F/M</b>                                          | 38/17                             | 43/24                             | 6/17              |
| <b>Días de síntomas. Mediana (rango intercuartílico)</b> | 3 (5-3)                           | 4 (6-2)                           | 5 (6-4)           |
| <b>Presentan comorbilidad</b>                            | 27% (15/55)                       | 24% (16/66)*                      | 76% (16/21)*      |

DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave. F: femenino. M: Masculino. \*Un paciente sin datos para DCSA y dos para DG.

##### 4.2.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes con dengue seleccionados

No se hallaron diferencias significativas entre los promedios de días de síntomas y de edad entre los dos grupos DCSA y DSSA ( $p=0,5612$  y  $p=0,9996$ , respectivamente). Al comparar los grupos DCSA y DSSA con el grupo DG se detectaron promedios mayores para la edad y días de síntomas para el último grupo, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,0001$  y  $p=0,0334$ ,

respectivamente). Hubo un predominio del sexo femenino en los grupos de DSSA (69%) y DCSA (64%), no así en el grupo DG donde las mujeres fueron minoría (30%).

La proporción de pacientes con al menos una comorbilidad fue mayor en aquellos que desarrollaron dengue grave comparando con los grupos DCSA y DSSA, correspondiendo a un 84% (16/19;  $p < 0,0001$ ). 58% (11/19) padecía HTA, la enfermedad de base más frecuentemente reportada por todos los pacientes.

Se encontró que las proporciones de internados fue de 27% en pacientes DSSA (15/55), 79% en DCSA (52/66) y 100% (23/23) en DG.

No se hallaron registros de internación prolongada (más de una semana) o desarrollo de síntomas severos en los pacientes del grupo DSSA. Si bien este grupo de pacientes no presentaba signos de alarma y correspondieron a cuadros leves, un 27% fue internado siguiendo la Guía de Manejo Clínico de Dengue del Ministerio de Salud Pública (79) por presentar condiciones concomitantes como embarazo, enfermedades de base y extremos de edad, así como condiciones sociales. No se registraron óbitos de pacientes de los grupos DSSA y DCSA pero sí en el grupo DG, con 95% de los pacientes fallecidos (22/23). Según los certificados de defunción a los que se pudo acceder en HC-IPS (17/22), 6 pacientes fallecieron por shock hemorrágico, 6 por shock mixto, 4 por shock distributivo y 1 por falla multiorgánica. 6 fallecieron al sexto día de enfermedad, otros 6 al octavo, 2 fallecieron al quinto día y 2 al séptimo día. En los días tres, cuatro y nueve de enfermedad falleció un paciente. No se encontró registro del día de muerte de tres pacientes, debido a que fueron trasladados a otros centros hospitalarios.

Aunque la fiebre siempre fue el síntoma más común en todos los pacientes, se observó que otros síntomas leves tuvieron una distribución de frecuencias diferente entre los grupos, como por ejemplo la cefalea, bastante menos reportado en solo 8% (8/23) de los pacientes DG respecto a los demás grupos: 90% (60/67) para DCSA y 91% (50/55) para DSSA. La misma situación se observa para dolor retroocular, conjuntivitis y rash (**Tabla 4.6**). Se observó sangrado en los grupos DG y DCSA, pero más frecuentemente entre los pacientes del último grupo mencionado. El sitio de sangrado registrado para los pacientes DG fue en encías (**Tabla 4.6**). Para el grupo DCSA, el sitio de sangrado más comúnmente reportado fue la nariz.

#### **4.2.2 Resultados de pruebas laboratoriales de pacientes confirmados de dengue**

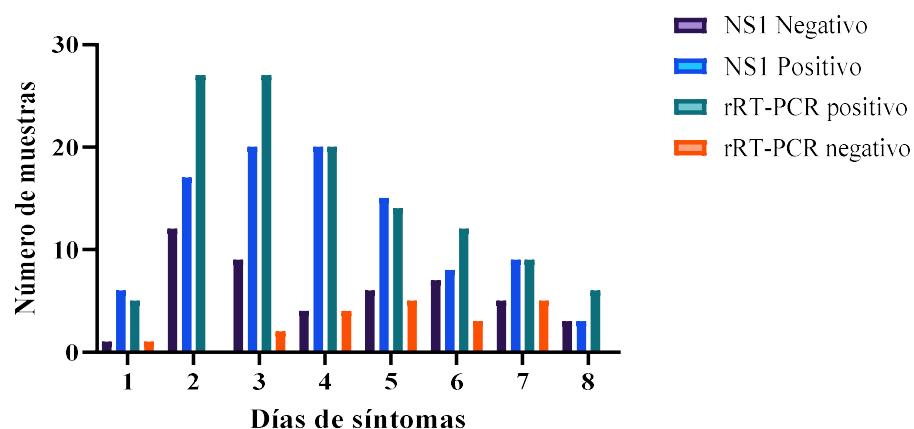
68% (98/145) de los pacientes resultó positivo para la detección de NS1 de DENV por pruebas rápidas. De las 145 muestras procesadas por rRT-PCR, se obtuvieron 138 resultados, ya que en 7 no se detectó el control interno. 87% (120/138) de las muestras procesadas fueron positivas por esta técnica y 13% (18/138) negativas. 114 pudieron ser tipificadas, siendo el DENV-4 detectado en 77% (88/114) de los casos en muestras de los años 2019 y 2020. El DENV-1 se detectó en 16% (18/114) de las muestras, que correspondieron al año 2018, y el DENV-2 en 7% (8/114) de las muestras, todas del 2019 y 2020. La mayor parte de los resultados positivos para NS1 y rRT-PCR se obtuvieron entre el segundo y quinto día de enfermedad (**Figura 4.2**). Los resultados de pruebas de dengue por grupo se observan en la **Tabla 4.6**.

**Tabla 4.6.** Características clínicas de pacientes de dengue clasificados según criterios de la OMS, 2009.

|                                          | DSSA        | DCSA        | DG          |
|------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Número de casos</b>                   | 55          | 67          | 23          |
| <b>Género F/M</b>                        | 38/17       | 43/24       | 6/17        |
| <b>Edad, mediana (RIC)</b>               | 29 (46-21)  | 31 (48-20)  | 67 (75-53)  |
| <b>Sitio clínico</b>                     |             |             |             |
| HVE                                      | 4           | 7           | 4           |
| IICS                                     | 1           | 5           | -           |
| IPS-HC                                   | 50          | 55          | 19          |
| <b>Comorbilidades</b>                    | 15/55 (27%) | 16/65 (25%) | 16/21 (84%) |
| <b>Días de síntomas, mediana (RIC)</b>   | 3 (5-3)     | 4 (6-2)     | 5 (6-4)     |
| <b>Signos y síntomas</b>                 |             |             |             |
| Fiebre                                   | 52 (95%)    | 65 (97%)    | 22 (96%)    |
| Cefalea                                  | 50 (91%)    | 60 (90%)    | 8 (35%)     |
| Mialgia                                  | 42 (76%)    | 59 (88%)    | 15 (65%)    |
| Artralgia                                | 40 (73%)    | 58 (87%)    | 14 (61%)    |
| Decaimiento                              | 32 (58%)    | 45 (67%)    | 5 (22%)     |
| Náuseas                                  | 26 (47%)    | 37 (55%)    | 11 (48%)    |
| Dolor retroocular                        | 24 (44%)    | 34 (51%)    | 4 (17%)     |
| Conjuntivitis                            | 19 (35%)    | 34 (51%)    | 2 (9%)      |
| Dolor de espalda (cerca de los pulmones) | 17 (31%)    | 35 (52%)    | -           |
| Rash                                     | 16 (29%)    | 28 (42%)    | 2 (9%)      |
| Dolor abdominal                          | 1 (2%)      | 36 (54%)    | 7 (30%)     |
| Vómitos                                  | 10 (18%)    | 22 (33%)    | 7 (30%)     |
| <b>Sangrado</b>                          | -           | 33 (49%)    | 4 (17%)     |
| Encías                                   | -           | 8 (24%)     | 3 (75%)     |
| Nariz                                    | -           | 9 (52%)     | -           |
| Vagina                                   | -           | 7 (21%)     | -           |
| Orina                                    | -           | 4 (12%)     | -           |
| Heces                                    | -           | 3 (9%)      | -           |
| Sin datos                                | -           | 1 (3%)      | 1 (25%)     |
| <b>Tos</b>                               | 10 (18%)    | 16 (24%)    | 4 (17%)     |
| <b>Diarrea</b>                           | 10 (18%)    | 16 (24%)    | 3 (13%)     |
| <b>Dolor de garganta</b>                 | 6 (11%)     | 10 (18%)    | 3 (13%)     |
| <b>Dificultad para respirar</b>          | 1 (2%)      | 1 (2%)      | 15 (65%)    |
| <b>Edema</b>                             | 1 (2%)      | 12 (18%)    | 1 (4%)      |

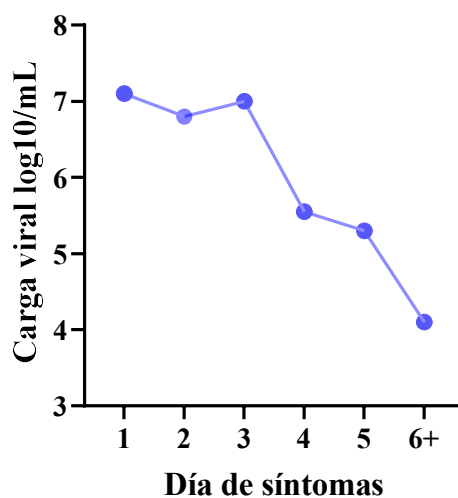
DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave. F: femenino. M: masculino.

La prueba de NS1 se realizó a las 145 muestras, obteniendo la mayor cantidad de resultados positivos en el día 2 de síntomas (**Figura 4.2**).



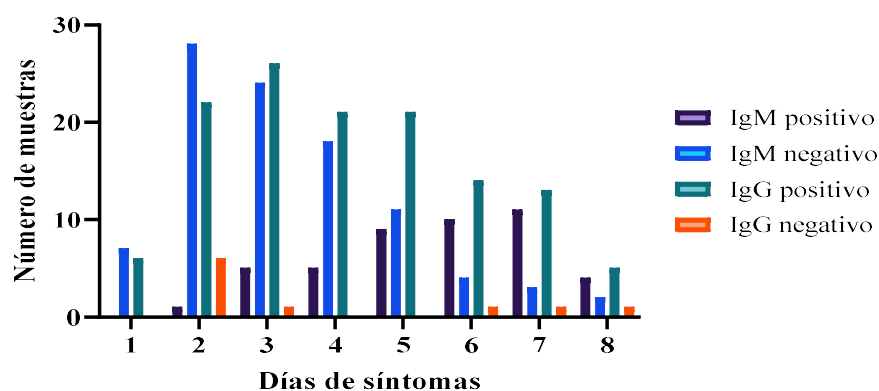
**Figura 4.2.** Resultados de antígeno NS1 de dengue y rRT-PCR para dengue vs. días de síntomas en el cual fue realizada la prueba.

Se logró cuantificar la carga viral en 46 muestras de DSSA, 46 de DCSA y 13 de DG obteniéndose las siguientes medias de  $\log_{10}$  de copias/mL:  $6,32 \pm 1,89$ ;  $5,95 \pm 1,62$  y  $6,67 \pm 1,5$ , respectivamente. La media de la carga viral fue mayor en los primeros tres días de síntomas como se observa en la **Figura 4.3**. No se encontraron diferencias significativas al comparar las medias de las cargas virales de los tres grupos de pacientes ( $p=0,3516$ ).



**Figura 4.3.** Promedios de carga viral versus (vs.) días de síntomas en 105 muestras de pacientes con dengue seleccionados para el estudio de marcadores.

Las pruebas de anticuerpos fueron realizadas a todas las muestras y 31% (45/145), resultó negativa para anticuerpos IgM anti-DENV, los resultados positivos se obtuvieron mayormente en muestras tomadas a partir del sexto día de enfermedad (**Figura 4.4**). 87% (126/145) fueron positivos para IgG anti-DENV.



**Figura 4.4.** Resultados de anticuerpos IgM e IgG anti-DENV vs. días de síntomas en el que fue realizada la prueba.

Los parámetros del laboratorio clínico para cada grupo se encuentran resumidos en la **Tabla 4.7**. Se recogieron todos los resultados medidos en el mismo día de síntomas en el que se realizaron todos los demás análisis(**Tabla 4.7**).

Respecto al recuento de leucocitos, se observó una mediana significativamente mayor en el grupo DG respecto a los grupos DSSA y DCSA ( $p=0,0017$  y  $p=0,0007$  para DSSA vs. DG y DCSA vs. DG, respectivamente; **Figura 4.5**).

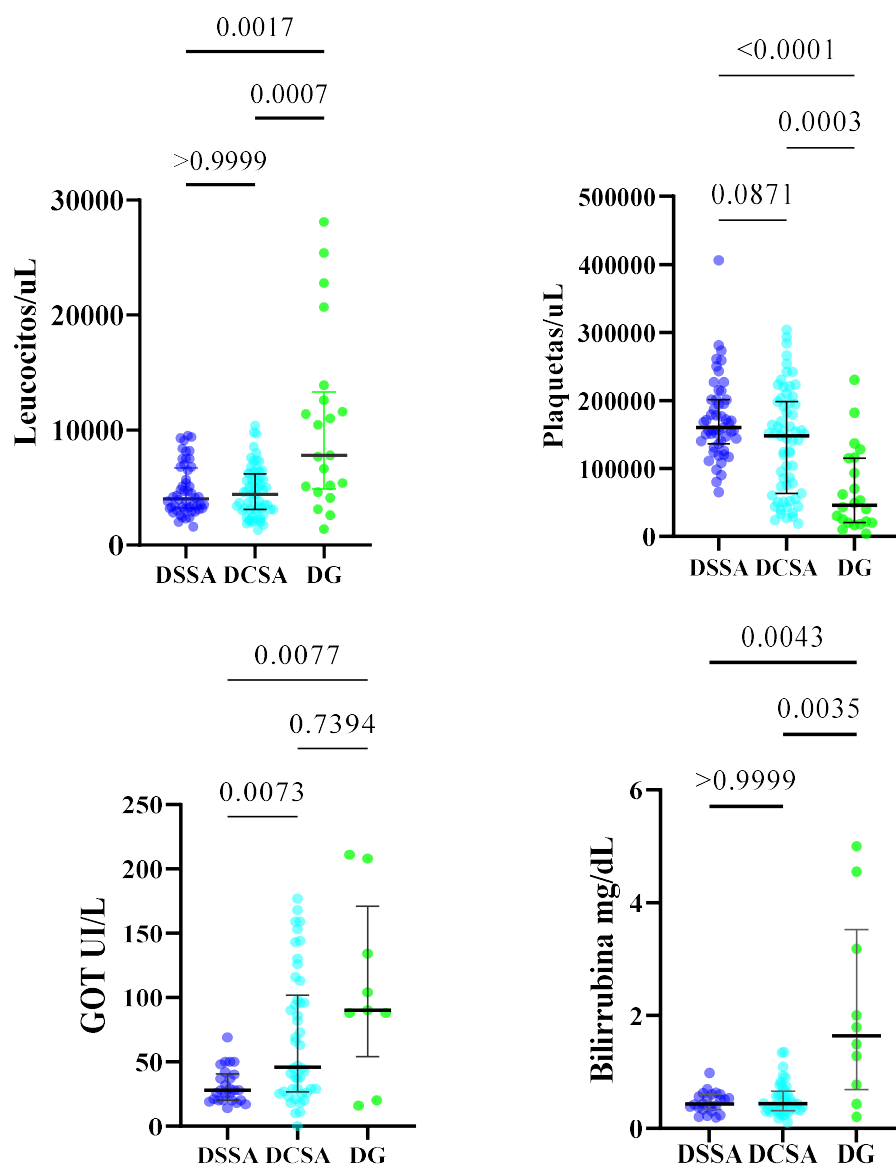
Las medianas de neutrófilos tuvieron el mismo comportamiento ( $p<0,0001$  para DSSA vs. DG y  $p=0,0007$  para DCSA vs. DG). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medianas de linfocitos ( $p=0,3973$ ), eritrocitos ( $p=0,3004$ ), hemoglobina ( $p=0,0674$ ), hematocrito ( $p=0,1377$ ), GPT ( $p=0,1058$ ) entre los grupos de pacientes (**Figura 4.5**).

**Tabla 4.7.** Datos laboratoriales de pacientes con dengue confirmado seleccionados.

|                                                           | DSSA<br>n=55     | DCSA<br>n=67     | DG<br>n=23         |
|-----------------------------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| <b>Pruebas diagnósticas de dengue</b>                     |                  |                  |                    |
| <b>rRT-PCR positivo</b>                                   | 51/55 (93%)      | 53/63 (84%)      | 16/20 (80%)        |
| <b>NS1 positivo</b>                                       | 30/55 (55%)      | 47/67 (70%)      | 21 /23(91%)        |
| <b>IgM anti-DENV (ELISA) positivo</b>                     | 14/55 (25%)      | 26/67 (39%)      | 5/23 (22%)         |
| <b>IgG anti-DENV (ELISA) positivo</b>                     | 48/55 (87%)      | 56/67 (84%)      | 22/23 (96%)        |
| <b>Parámetros laboratoriales de rutina. Mediana (RIC)</b> |                  |                  |                    |
| <b>Leucocitos/uL.10<sup>3</sup> * n=137</b>               | 4,1 (6,7-3,2)    | 4,4 (6,2-3,1)    | 7,8 (13,2-4,9)     |
| <b>Neutrófilos/uL.10<sup>3</sup> * n=137</b>              | 2,2 (2,8-1,7)    | 2,5 (4,2-1,5)    | 6,2 (10,2-3,9)     |
| <b>Linfocitos/uL.10<sup>3</sup> * n=137</b>               | 1,1 (1,5-0,8)    | 0,9 (1,5-0,7)    | 0,8 (2,1-0,5)      |
| <b>Eritrocitos/uL .10<sup>6</sup> n=136</b>               | 4,5 (4,8-4,2)    | 4,5 (4,8-4,2)    | 4,3 (4,9-3,6)      |
| <b>Hemoglobina g/dL n=137</b>                             | 14 (14-13)       | 13 (14-13)       | 12 (14-11)         |
| <b>Hematocrito % n=134</b>                                | 39 (42-37)       | 40 (42-36)       | 37 (41-31)         |
| <b>Plaquetas/uL.10<sup>3</sup>*, n=137</b>                | 160 (201-136)    | 148 (198-63)     | 46 (115-20)        |
| <b>GPT UI/L n=84</b>                                      | 30 (53-17)       | 44 (65-19)       | 63 (96-27)         |
| <b>GOT UI/L * n=85</b>                                    | 28 (41-20)       | 46 (102-27)      | 90 (171-54)        |
| <b>Bilirrubina mg/dL * n=74</b>                           | 0,43 (0,60-0,33) | 0,42 (0,60-0,31) | 1,64 (3,5-0,69)    |
| <b>Fosfatasa alcalina U/L* =76</b>                        | 171 (192-139)    | 173 (541-140)    | 281 (577-232)      |
| <b>Urea sangre mg/dL* n=71</b>                            | 25 (38-18)       | 20 (25-14)       | 112 (140-56) *     |
| <b>Creatinina sangre mg/dL* n=68</b>                      | 0,93 (1,10-0,76) | 0,76 (0,96-0,65) | 2,70 (3,80-1,30) * |

\*Con diferencias significativas entre los grupos. \* Se excluyeron valores de tres pacientes por padecer enfermedad renal crónica y de uno por padecer colecistopatía. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

Comparando las medianas de las plaquetas, se encontró diferencia significativa entre los grupos DSSA vs. DG y DCSA vs. DG ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,0003$ , respectivamente) con los valores más bajos entre los pacientes DG (**Figura 4.5**), se excluyó del análisis el recuento plaquetario de un paciente que presentaba púrpura trombocitopénica idiopática como comorbilidad y que tuvo DSSA. Analizando los valores de GOT, se detectaron diferencias significativas entre los grupos DG vs. DSSA y DSSA vs. DCSA ( $p = 0,0077$  y  $p = 0,0073$ , respectivamente), no así entre DCSA y DG ( $p = 0,7394$ ) (**Figura 4.5**). La mediana de la bilirrubina fue significativamente mayor para DG respecto a los demás grupos ( $p = 0,0054$  para DG vs. DSSA y  $p = 0,0021$  para DG vs. DCSA) (**Figura 4.5**).



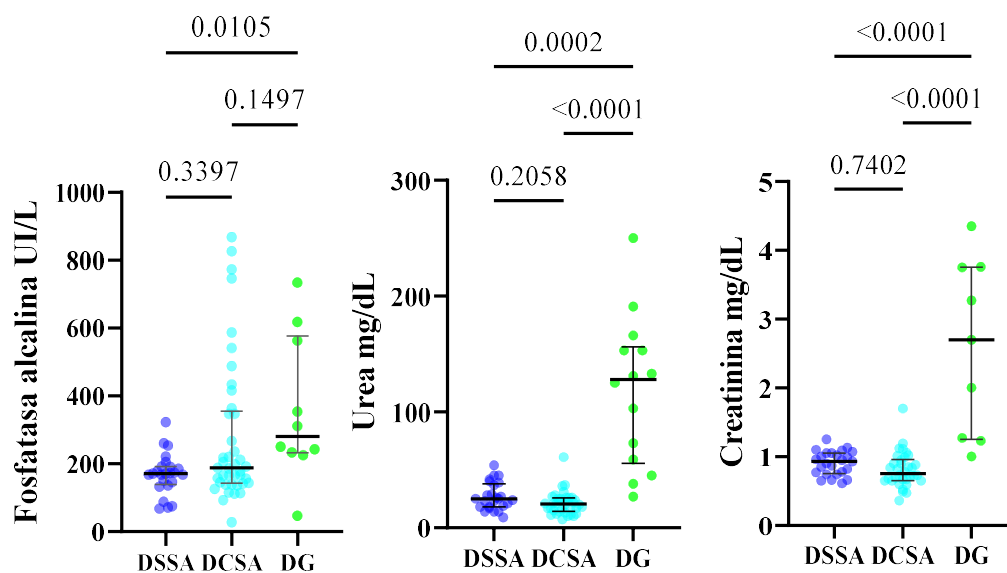
**Figura 4.5.** Comparaciones de leucocitos, plaquetas, GOT y bilirrubina total entre grupos de pacientes con dengue confirmado. Se indican los valores de p, mediana y rango intercuartílico. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

La mediana de la fosfatasa alcalina fue mayor en el grupo DG respecto a DSSA ( $p=0,0105$ ), pero sin diferencias significativas entre DCSA y DSSA ( $p=0,3397$ ) ni DG vs DCSA ( $p=0,1497$ ) (**Figura 4.6**).

Un comportamiento muy similar se observó entre los analitos urea y creatinina sanguíneas (**Figura 4.6**), que presentaron diferencias significativas entre los grupos DG vs. DSSA y DG vs. DCSA ( $p\leq 0,0002$  y  $p<0,0001$ , respectivamente para cada



variable). Para los análisis de urea y creatinina se excluyeron datos de tres pacientes por padecer enfermedad renal crónica y de uno por padecer colecistopatía.



**Figura 4.6.** Comparaciones de fosfatasa alcalina, urea y creatinina entre grupos de pacientes con dengue confirmado. Se indican los valores de p, mediana y rango intercuartílico. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

### 4.2.3 LBP y CMA-1 en pacientes con dengue confirmado

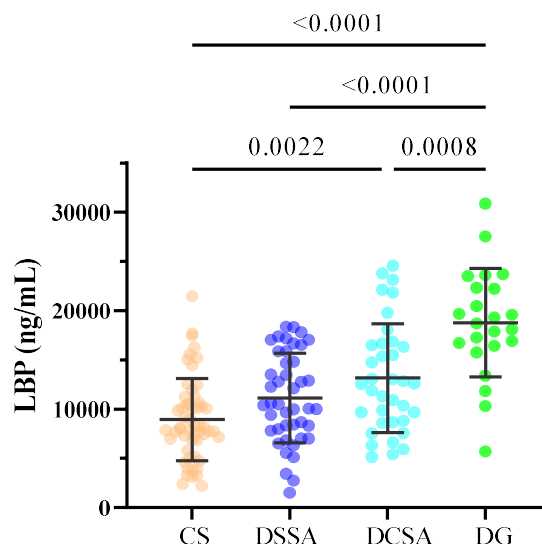
Se evaluaron los marcadores LBP y CMA-1 en pacientes con diagnóstico confirmado de dengue, los resultados se observan en la **Tabla 4.8**.

**Tabla 4.8.** Resultados de LBP y CMA-1 en muestras de pacientes con dengue confirmado.

|                                   | CS n=55           | DSSA               | DCSA               | DG                  |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <b>LBP ng/mL</b> (promedio, DE)   | 8.932 $\pm$ 4.182 | 11.116 $\pm$ 4.561 | 12.777 $\pm$ 5.413 | 18.766 $\pm$ 5.510  |
| <b>CMA-1 ng/mL</b> (mediana, RIC) | -                 | 0,48(0,88-0,35)    | 1,35 (3,30-0,29)   | 38,90 (69,20-15,90) |

Los tamaños de muestra para el análisis de LBP fueron de 44 para DSSA, 41 para DCSA y 23 para DG. Los tamaños de muestra para el análisis de CMA-1 fueron de 55 para DSSA, 67 para DCSA y 23 para DG. CS: Controles sanos. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

Al comparar el promedio de LBP sérico entre controles sanos y todos los pacientes con dengue (n=108) se encontró que es significativamente mayor en los pacientes con dengue ( $p < 0,0001$ ). Como se observa en la **Figura 4.7**, se compararon los promedios entre los grupos de CS, DSSA, DCSA y DG, detectándose diferencias, las más significativas fueron entre los grupos CS vs. DG y DSSA vs. DG ( $p < 0,0001$  para ambos).

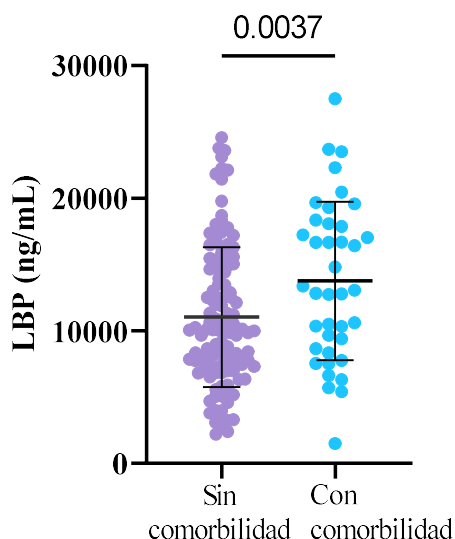


**Figura 4.7.** Comparación de concentraciones de LBP entre los grupos de CS (n=55) pacientes DSSA (n=44), DCSA (n=41) y DG (n=23). Se indican los valores de p, promedio y desviación estándar. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

El promedio de concentración de LBP fue significativamente mayor en el grupo DCSA vs. controles ( $p=0,0022$ ) y también se vio mayor concentración en el grupo DG al comparar con DCSA ( $p<0,0001$ ). No se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios CS vs. DSSA ni DSSA vs. DCSA ( $p=0,1169$  y  $p=0,244$ , respectivamente).

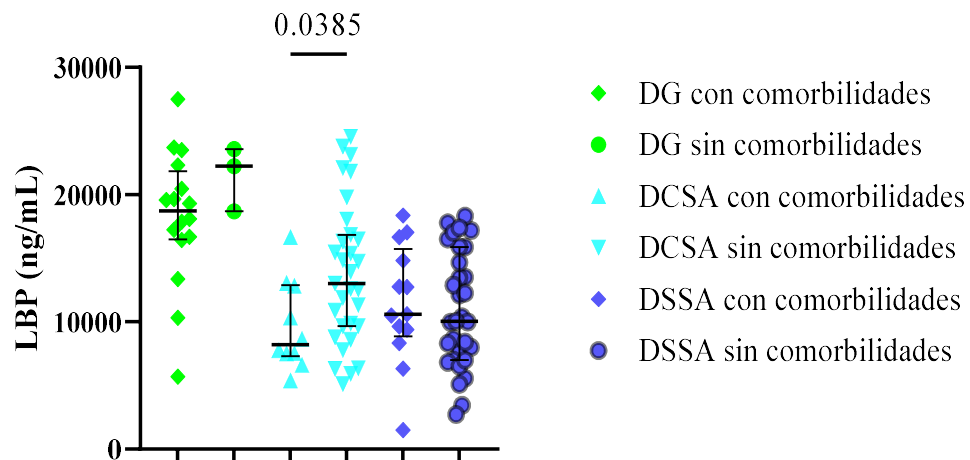
Se analizaron las concentraciones de LBP en los pacientes con dengue respecto a los días de síntomas, no se halló una correlación significativa ( $p=0,1915$ ).

Se compararon los promedios de las concentraciones de LBP entre pacientes con comorbilidad ( $n=120$ ) y sin comorbilidad ( $n=39$ ) detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,0037$ , **Figura 4.8**).



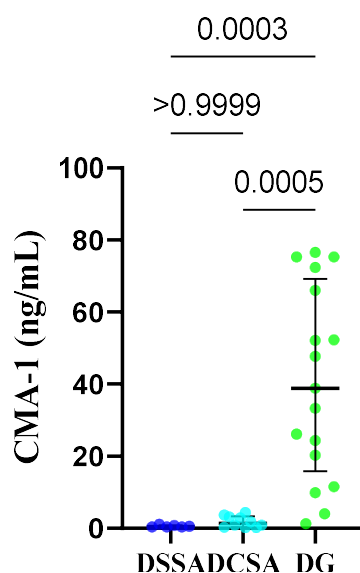
**Figura 4.8.** Comparación de concentraciones de LBP de acuerdo con la comorbilidad en los pacientes incluidos. Referencias: ns= no significativo. Se indican la media y desviación estándar. Sin comorbilidad  $n=120$ . Con comorbilidad  $n=39$ , no se tenían datos de 4 pacientes.

También se compararon las medianas de concentraciones dentro de los grupos de pacientes de acuerdo con la presencia o no de comorbilidades (**Figura 4.9**), encontrándose una mediana significativamente mayor en el grupo DCSA sin comorbilidades al compararlo con su par con comorbilidades. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los demás grupos.



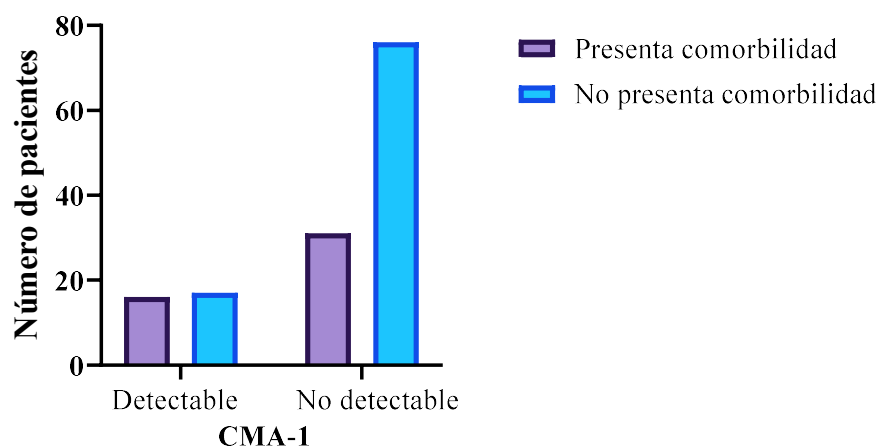
**Figura 4.9.** Concentraciones de LBP en grupos de pacientes separados de acuerdo con el padecimiento o no de comorbilidades. Se indican los valores de p, mediana y rango intercuartílico. DG: dengue grave, DCSA: dengue con signos de alarma, DSSA: dengue sin signos de alarma.

En cuanto a las determinaciones de CMA-1, se obtuvieron valores por encima del límite de detección en un 25% (36/145) de las muestras y 75% (110/145) por debajo. En el grupo DG, CMA-1 se detectó en 17 muestras con una mediana de 38,8 ng/mL. En los grupos DSSA y DCSA solo se detectaron en 7 y 12 muestras, con medianas de 0,4750 ng/mL y 1,345 ng/mL, respectivamente. Hubo diferencias significativas entre DG vs. DSSA y DG vs. DCSA ( $p=0,0005$  y  $p=0,0003$ , respectivamente). No así entre DCSA vs. DSSA ( $p>0,9999$ ) (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10.** Comparación de concentraciones de CMA-1 entre los grupos de pacientes DSSA ( $n=55$ ), DCSA ( $n=67$ ) y DG ( $n=23$ ). Se indican los valores de  $p$ , mediana y rango intercuartílico. DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. DG: Dengue grave.

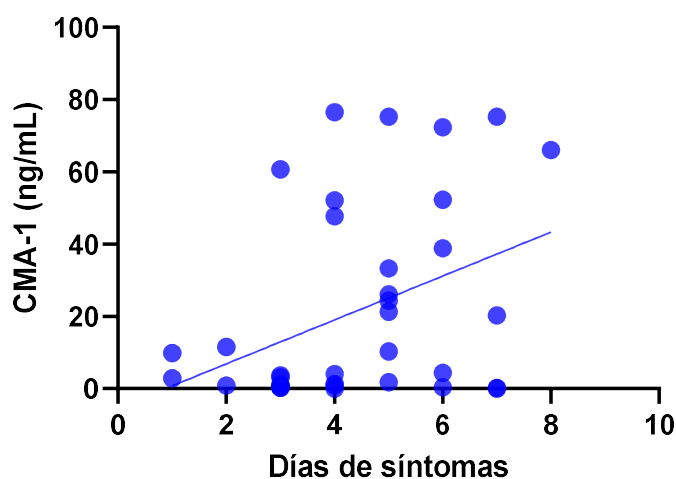
Se analizó la asociación entre tener comorbilidades y un resultado de CMA-1 detectable, para ello se dicotomizó la concentración de CMA-1 en detectable y no detectable y se separaron estos resultados en dos grupos de acuerdo con la presencia o no de comorbilidades (**Figura 4.11**) en una tabla de contingencia. No se halló una asociación entre comorbilidad y resultado detectable/no detectable de CMA-1 ( $p=0,0566$ ).



**Figura 4.11.** CMA-1 según grupos de pacientes con y sin comorbilidad.

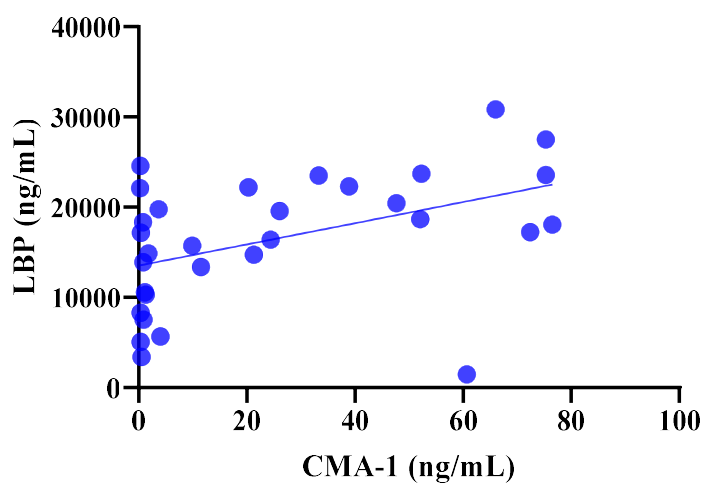
En la **Tabla 4.9** se observan todas las concentraciones de CMA-1 obtenidas y la presencia o ausencia de comorbilidades en los pacientes. No se detectó una coincidencia entre una comorbilidad particular o tipo de comorbilidad a la que pueda atribuirse niveles elevados de CMA-1. También se observa que pacientes sin enfermedades de base pueden tener niveles elevados de CMA-1, por lo que esta asociación podría no tener relevancia.

Se analizó la variación de los niveles de CMA-1 en los pacientes con dengue respecto a los días de síntomas (**Figura 4.12**), hallándose una correlación positiva significativa ( $p=0,0255$ ,  $r=0,3190$ ). Al analizar solo el grupo DG se detectó una correlación positiva ( $r=0,3738$ ) pero sin significancia estadística ( $p=0,0789$ ).



**Figura 4.12.** Análisis de correlación de concentraciones de CMA-1 vs. días de síntomas en pacientes con dengue.  $r=0,3190$ ;  $p=0,0255$ ,  $n=38$ .

También se realizó un análisis de correlación lineal entre las concentraciones de CMA-1 y LBP (**Figura 4.13**), hallándose una correlación positiva con una  $r$  de 0,4166 y una asociación estadísticamente significativa representada por un valor de  $p=0,0099$ . Se incluyeron 31 resultados, ya que no se tuvieron en cuenta los resultados no detectables para CMA-1 ( $<0,3$  ng/mL). Al realizar este mismo análisis solo dentro del grupo DG, donde se obtuvo una mayor cantidad de resultados detectables de CMA-1, el valor de  $r$  aumenta a 0,6480 y el valor de  $p=0,0032$ . Esto indica que existe una relación entre las concentraciones de ambos analitos.



**Figura 4.13.** Análisis de correlación de concentraciones de CMA-1 vs. concentraciones de LBP en pacientes con dengue.  $r=0,4166$ ,  $p=0,0099$ ,  $n=31$ .

**Tabla 4.9.** Grupo, comorbilidades y concentración en muestras de pacientes con CMA-1 detectable.

| Grupo | Comorbilidades                                                      | Concentración CMA-1 ng/mL | Promedio por comorbilidad |
|-------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| DCSA  | Ninguna                                                             | 0,24                      | 11,5                      |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 0,24                      |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 0,3                       |                           |
| DSSA  | Ninguna                                                             | 0,35                      |                           |
| DSSA  | Ninguna                                                             | 0,35                      |                           |
| DSSA  | Ninguna                                                             | 0,4                       |                           |
| DSSA  | Ninguna                                                             | 0,55                      |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 0,86                      |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 1,8                       |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 2,9                       |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 3,7                       |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 4,4                       |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 10,3                      |                           |
| DG    | Ninguna                                                             | 20,3                      |                           |
| DCSA  | Ninguna                                                             | 21,3                      |                           |
| DG    | Ninguna                                                             | 52,1                      |                           |
| DG    | Ninguna                                                             | 75,3                      |                           |
| DSSA  | LES                                                                 | 0,8                       | 28,6                      |
| DG    | LES                                                                 | 24,4                      |                           |
| DSSA  | LES                                                                 | 60,7                      |                           |
| DCSA  | Sin datos                                                           | 3,11                      | 26,3                      |
| DG    | Sin datos                                                           | 9,9                       |                           |
| DG    | Sin datos                                                           | 66                        |                           |
| DG    | DM mellitus, HTA                                                    | 26,1                      | 35,6                      |
| DG    | DM, enfermedad renal crónica, artrosis y síndrome demencial         | 4,01                      |                           |
| DG    | DM, HTA                                                             | 76,5                      |                           |
| DG    | DM, HTA, artrosis                                                   | 72,4                      |                           |
| DG    | DM, HTA, enfermedad cardíaca                                        | 1,3                       |                           |
| DG    | DM, HTA, enfermedad renal crónica                                   | 33,3                      | 33,3                      |
| DG    | Enfermedad cardíaca                                                 | 75,3                      | 75,3                      |
| DSSA  | Epilepsia                                                           | 1,14                      | 1,1                       |
| DG    | HTA, colecistopatía                                                 | 52,3                      | 34,2                      |
| DG    | HTA, enfermedad cardíaca                                            | 11,5                      |                           |
| DG    | HTA, enfermedad renal crónica, enfermedad cardíaca, hernia inguinal | 38,9                      |                           |
| DG    | Infección urinaria                                                  | 47,7                      | 47,7                      |
| DCSA  | Polipomatosis familiar                                              | 0,89                      | 0,9                       |

LES= lupus eritematoso sistémico, DM= *Diabetes mellitus*, HTA= hipertensión arterial, ERC= enfermedad renal crónica. N=35. Observaciones: algunos valores no se incluyeron en los análisis estadísticos debido al análisis de *outliers* realizado con el método ROUT.



## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Pacientes con sospecha de dengue

En este estudio han sido reclutados un total de 1.490 pacientes con cuadro sospechoso de dengue en tres puntos de reclutamiento, en la ciudad de Asunción y otros dos en área metropolitana. La procedencia principal de estos pacientes fueron ciudades del Departamento Central y de la Capital, aunque se ha logrado incluir pacientes de todos los departamentos del país, exceptuando solo dos, Misiones y Ñeembucú, que según datos de la Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS) reportaron muy pocos casos durante los años de reclutamiento para este estudio. Sin embargo, la mayor cantidad de casos a nivel país, coincide con este estudio, pues se concentraron en Capital y Central durante 2018, 2019 y 2020 (80).

El punto de reclutamiento fue el HC-IPS durante el 2019 e inicios del 2020 (enero hasta la primera semana de marzo). Este Hospital representa al nivel terciario especializado, con 93 servicios y 8 niveles de complejidad brindando atención a pacientes de diferentes localidades, pues el IPS tiene a su cargo la administración del Seguro Social en Paraguay.

Según registros del Departamento de Epidemiología del HC-IPS, en el año 2019 se realizaron al menos 1.000 notificaciones de casos febriles, y en el 2020 este número se elevó 5 veces más, a 4.939, debido a la gran epidemia de esta época. Los registros de los laboratorios de Urgencias y Emergencias también demuestran un incremento respecto a los pedidos recibidos de la determinación de antígeno NS1 de DENV por inmunocromatografía en el 2019. Se realizaron de marzo a diciembre (periodo de reclutamiento) un total de 3.016 pruebas y en el 2020, solo considerando los meses de enero a marzo, 7.370 pruebas.

33,4% de los pacientes tenía entre 16 y 30 años. El sexo predominante fue el femenino (60,1%), esto concuerda con varios estudios (81–84), pues aparentemente las mujeres concurren más a los centros de salud ante la aparición de los síntomas, y en parte, debido a que algunas pueden encontrarse en periodo de gestación. En este estudio 8,7% de las mujeres eran gestantes.

De las 1.490 muestras incluidas, se realizó la prueba de antígeno NS1 de DENV a 1.268 muestras de las cuales solo un 26% dio positivo. Con el análisis de rRT-PCR, al analizar 1.021 muestras, se detectó un porcentaje mayor, de 36%. Estos datos son suficientes para evidenciar la mayor sensibilidad de la técnica molecular. Al analizar 960 muestras por ambas técnicas se detectaron 156 resultados que fueron informados como falsos negativos por la prueba rápida (16%). Cardozo y col. (84) en una población similar reportaron un 20,5% de falsos negativos por pruebas rápidas, los cuales fueron detectados por RT-PCR anidada y secuenciación.

64% de las muestras fueron negativas para dengue según la rRT-PCR. Otros estudios en países endémicos reportan porcentajes inferiores a 42% de casos confirmados respecto al total de sospechosos testados para dengue (85–87) y estos negativos podrían tratarse de una variedad de cuadros patológicos (79), ya que se reportaron síntomas bastante inespecíficos. Esto demuestra la importancia del laboratorio en el diagnóstico diferencial de síndromes febriles.

Las infecciones detectadas fueron mayormente por el DENV-4 (62%), seguido por el DENV-1 (31%) y en tercer lugar, DENV-2 (7%). Esto coincide con la circulación de tipos a nivel país reportado por la DGVS en la temporada de reclutamiento. DENV-3 no circula desde el 2008 en Paraguay. El DENV-4 se mantiene en una circulación intermitente desde el 2012, y en 2020, cuando circula de forma predominante por primera vez, ocurrió la mayor cantidad de muertes relacionadas a DENV-4 en el Paraguay (52), por lo que los casos graves por este tipo han sido poco estudiados aún en el país.

La HTA es una enfermedad de alta prevalencia en el Paraguay, según datos de Ministerio de Salud publicados en el 2014, esta asciende a 47% en mayores de 15 años (88). En concordancia con lo mencionado esta fue la comorbilidad más común en la población en estudio, con una prevalencia del 16%.

## **5.2 Selección de casos de dengue y clasificación según criterios OMS, 2009**

Entre los pacientes infectados por DENV, el diagnóstico diferencial temprano del virus y el tratamiento oportuno son importantes para evitar las complicaciones asociadas y la mortalidad, considerando que no se dispone de tratamiento antiviral

específico. Las manifestaciones clínicas son actualmente la única herramienta para predecir la enfermedad grave de dengue (37).

La combinación de pruebas diagnósticas es importante en el diagnóstico de dengue (89). Como se vio en este estudio, ninguna prueba por sí sola fue capaz de detectar la infección en el 100% de los casos, aunque la más sensible fue la rRT-PCR. Esto es debido a que cada tipo de prueba tiene una utilidad diferente de acuerdo con los días de síntomas en el que se toma la muestra (48).

145 de 508 casos confirmados de dengue fueron clasificados de acuerdo con los criterios de la OMS, 2009. La cantidad de muestras a incluir fue limitada principalmente debido a que no se pudo acceder a los datos porque en nuestro país no se cuenta con un sistema completamente informatizado y sistematizado de registro de datos clínicos de los pacientes, además, en gran parte de los casos la información clínica no se encuentra centralizada, por lo cual se debe recurrir a varias fuentes para obtener información completa y veraz sobre la evolución del paciente. Otro aspecto que se vio en el análisis de las historias clínicas es que no siempre se utilizan los criterios de la OMS para la clasificación de los casos de dengue.

La mayoría de los pacientes de los grupos DSSA y DCSA fueron pareados entre sí, por lo que no se observaron diferencias significativas entre estos grupos en cuanto a las características demográficas, no así al comparar con los pacientes de DG, quienes presentaron mayor promedio de edad y de días de síntomas respecto a ambos grupos mencionados (**Tabla 4.5**).

Los casos de DG se han asociado a factores demográficos como edad y sexo (67,90). Generalmente, suele verse casos más severos en los extremos etarios, es decir en niños y adultos mayores (39). En este estudio los casos graves fueron en pacientes adultos mayoritariamente, solo un caso fue pediátrico (de 14 años). Una mayor edad suele estar asociada a una mayor frecuencia de comorbilidades e infecciones secundarias de dengue, lo cual puede aumentar la probabilidad de casos más graves en personas mayores (1). Aunque esta relación no siempre se cumple, pues también se reportan casos severos en pacientes adultos jóvenes (71). En el estudio de Sahu y col. (91), se vio que la edad no tenía asociación con desarrollo de dengue grave. En el estudio de Vázquez y col. (92) en el que se incluyeron 60 muestras de pacientes

paraguayos con DG, la mayor parte de los pacientes tenía entre 20 y 39 años (33%). Por otro lado, en la cohorte en Sri Lanka de Sigera y col. (93), donde estudiaron una población de 86 pacientes adultos jóvenes con dengue, se vio que los pacientes que desarrollaron dengue grave tenían un promedio de edad significativamente inferior a los que no lo hicieron (19,5 vs. 28 años).

En el presente estudio se encontró una mayor frecuencia de comorbilidades en el grupo de DG respecto a los demás grupos. Del mismo modo, en el estudio de casos y controles de Aldama y col. (94) se incluyó una población similar a la de este estudio en la que se compararon pacientes sobrevivientes y no sobrevivientes de dengue. La edad media en los casos mortales de dengue ( $n=61$ ) fue de  $51\pm 17$  años y se encontró que la presencia de comorbilidades (HTA principalmente) fue un factor asociado a la mortalidad.

La severidad de los cuadros se ha asociado al tipo 2 del DENV en varios reportes (46,95,96). También a genotipos específicos del virus (97), aunque siempre en relación con factores ambientales como las infecciones secundarias (1).

El tipo de DENV más detectado en los tres grupos de pacientes fue el DENV-4, seguido de DENV-1. Mientras que el DENV-2 solo se detectó en los grupos DSSA y DCSA. DENV-4 es considerado por algunos autores como un tipo que genera mayoritariamente cuadros asintomáticos y tiene un bajo riesgo de causar grandes epidemias (90). En este estudio se han detectado solo DENV-4 y DENV-1 en los casos graves.

En varios estudios se ha reportado una relación entre la viremia y la severidad del dengue. En la presente, no se encontró diferencia significativa entre los promedios de carga viral de los grupos de gravedad, lo cual podría estar relacionado con varios factores, como las características del virus, la población de pacientes o los días de síntomas, que en este estudio es de hasta 8 días. Talarico y col. (98) reclutaron 77 pacientes pediátricos de Paraguay infectados con DENV-1 y DENV-2 sin detectar una relación entre la viremia y la severidad de la enfermedad. Mientras que, Rojas y col. (99) han caracterizado a la población de pacientes de HVE (también incluida en este estudio) con 115 casos de dengue, principalmente por DENV-1. Aunque no analizaron la viremia en función a la gravedad de los casos, se encontró una mayor carga viral en

pacientes que requirieron internación. Así como estos estudios en población paraguaya, estudios en otras poblaciones de varias edades y tipos de DENV reportan diferentes hallazgos respecto a la carga viral y la gravedad de los casos (46,61,73,100).

### **5.3 Hallazgos laboratoriales**

Con respecto a los análisis clínicos, la mediana del recuento de plaquetas fue significativamente menor en el grupo DG (46.000/ $\mu$ L) respecto a los grupos DCSA (148.000/ $\mu$ L) y DSSA (160.000/ $\mu$ L). Sin embargo, no fueron significativas al comparar los grupos DCSA y DSSA. La reducción de plaquetas en casos graves es un hallazgo que se ha visto en varios estudios y en variada magnitud, no siempre se encuentra relacionado a la presencia de sangrado, pues este también puede darse a causa de factores vasculares o por desequilibrios en la coagulación (101). Tuan y col. (102) estudiaron 117 pacientes pediátricos vietnamitas con DG y reportaron en ellos una mediana de 110.000 plaquetas/uL que fue significativamente menor que en los casos no graves. Sahu y col. (91) en su estudio con 338 pacientes adultos de India reportaron diferencias significativas entre los pacientes DSSA, DCSA y DG con una mediana de 40.200 plaquetas/uL en pacientes graves. Además, demostraron que la disminución de este parámetro estaba asociado a casos graves.

Es frecuente ver leucopenia en pacientes con dengue durante la fase aguda y este suele ser un criterio de diagnóstico clínico (39). Las medianas de leucocitos fueron significativamente mayores en pacientes DG (7.800/ $\mu$ L) con respecto a DCSA (4.025/ $\mu$ L) y DSSA (4.400/ $\mu$ L), pero no se encontraron diferencias significativas entre DSSA y DCSA. Sahu y col. (91) no encontraron diferencias significativas en el recuento de leucocitos entre los grupos de DG, DCSA y DSSA, cuyos promedios fueron similares a las obtenidas en el presente trabajo. La leucocitosis y neutrofilia observadas en los pacientes con DG pueden deberse al deterioro orgánico general de estos pacientes, al igual que los siguientes parámetros a discutir.

Respecto a los niveles de GOT, que es considerado un indicador de daño hepático, los valores más altos se encontraron en pacientes graves (mediana 90 UI/L), siendo el extremo superior 4.164 UI/L. Este valor extremo fue el único caso en el que se vio un valor mayor a 1.000, que es lo que señala uno de los criterios de DG de la OMS, 2009 (103). Otros estudios con pacientes de DG también reportan resultados

similares. Fernando y col.(27) realizaron un seguimiento a 55 pacientes adultos con dengue, de los cuales 22 desarrollaron DG. En este grupo se vio que los valores máximos de GOT fueron de alrededor de 300 UI/L, que correspondió al pico observado en el día 6 de síntomas. Entre los factores de riesgo asociados a la mortalidad en pacientes paraguayos adultos con dengue, reportado por Aldama y col. (94), se cita GOT con una mediana de 255 UI/L. Según Tuan y col. (102) la mediana de GOT en pacientes de DG fue 101UI/L. Finalmente, al igual que lo encontrado en este estudio, no es común encontrar valores de GOT superiores a 1.000 en los casos DG.

La bilirrubina total es otro marcador de afectación hepática, la mediana en pacientes con DG, de 1,64 mg/dL, fue significativamente mayor que en los otros grupos de pacientes. Este valor es comparable al obtenido por Aldama y col. (94), que reportaron una mediana de 1,31 mg/dL en pacientes con DG.

Aunque también se encuentra en otros órganos, la fosfatasa alcalina se utiliza para el control de la función hepática. En este estudio se encontró una mediana superior en el grupo DG (280,5 UI/L) respecto a los grupos DSSA (171 UI/L) y DCSA (172 UI/L). La mediana en el grupo DG fue significativamente mayor al comparar con el grupo DSSA. La mediana del grupo DCSA fue mayor que el de DSSA pero sin significancia estadística. Mallhi y col. (90) estudiaron factores asociados a una mayor cantidad de días de hospitalización de 667 pacientes con dengue de Malasia, identificando los valores elevados de fosfatasa alcalina como un factor que aumenta 2,3 veces la probabilidad de internarse más de 3 días, el punto de corte considerado fue de 53–168 UI/L en hombres y 42–98 UI/L en mujeres.

La infección por DENV ha sido asociado a desórdenes renales como una complicación del cuadro, la creatinina y la urea se utilizan como indicadores de estas alteraciones. En este estudio se vio que la mediana de creatinina fue significativamente mayor en DG (3,0 mg/dL) respecto a los grupos DSSA (0,93 mg/dL) y DCSA (0,76 mg/dL), pero no hubo diferencias significativas entre estos dos últimos. En el estudio de Thein y col. (104) en Singapur, compararon variables entre casos fatales y no fatales de dengue en pacientes pediátricos y adultos, algunos de los cuales padecían comorbilidades. Se encontró una mediana de creatinina igual a 1,42 mg/dL en

pacientes fatales de dengue y esto fue significativamente mayor que en los casos no fatales. Talarico y col. (98) estudiaron casos de dengue grave y no grave, encontrando una mediana de 0,57 mg/dL en 60 pacientes pediátricos paraguayos con DG sin encontrar diferencias significativas con los pacientes que no sufrieron complicaciones. En otro estudio transversal, llevado a cabo en Etiopía por Ferede y col. (105) incluyeron 102 pacientes con dengue, de los cuales reportaron que 20 pacientes sufrieron un aumento de creatinina superior a 1,1 mg/dL, aunque no se especifica si esto estuvo asociado a algún nivel de gravedad de la enfermedad.

La mediana de urea en este estudio fue significativamente mayor en los pacientes con DG (111,5 mg/dL) respecto a los demás grupos. No se vio diferencias significativas entre DSSA (25,0 mg/dL) y DCSA (20,5 mg/dL). En el estudio de Thein y col. (104) encontraron una mediana de urea igual a 51,95 mg/dL en los casos fatales, que resultó ser significativamente mayor a los casos no fatales. Talarico y col. (98) reportaron una mediana de urea de 23,5 mg/dL en pacientes pediátricos con DG, sin encontrarse diferencias significativas con el de dengue sin complicaciones. Lovera y col. (106) reportaron una media de urea de  $19,9 \pm 25$  mg/dL en 784 pacientes pediátricos paraguayos menores de 15 años que tenían dengue, aunque aquí no se relacionaron los niveles de urea con la gravedad de los casos. Aparentemente, al igual que la creatinina, niveles elevados de urea están asociados con casos más severos de dengue, lo cual puede ser debido a efectos del virus sobre el tejido o del sistema inmune.

#### **5.4 Determinación de CMA-1**

Las concentraciones de CMA-1 obtenidas en el grupo DG fueron superiores a las obtenidas en los demás grupos (38,90 ng/mL respecto a 0,47 ng/mL en DSSA y 1,35 ng/mL en DCSA). Esto coincide con otros reportes, como el de Sahu y col. (91) en Singapur, en el que reclutaron pacientes mayores de 14 años con hasta 4 días de síntomas. En el momento de la admisión se midió CMA-1 a 272 pacientes con DSSA y 66 con DCSA, a ellos se les siguió y finalmente 26 pacientes que desarrollaron DG fueron los que tuvieron las concentraciones más altas de CMA-1, aunque tampoco se encontró diferencia significativa entre DCSA y DSSA. Además, demostraron que la probabilidad de tener DG fue 1,8 veces mayor que la probabilidad de tener dengue no

grave con el aumento en una unidad en el nivel de CMA-1 sérico medido al momento de la admisión hospitalaria. En el estudio de Rathore y col. (61) en pacientes pediátricos de Sri Lanka, se detectaron diferencias significativas en la concentración de CMA-1 al comparar los grupos de DG y DCSA solo a partir del quinto día de enfermedad. St John y col. (47) encontraron concentraciones significativamente menores en controles sanos y febriles (dengue descartado) de Singapur al comparar con los pacientes que desarrollaron síndrome de shock por dengue (SSD) y dengue hemorrágico (DH). Al comparar entre los pacientes que sufrieron síndrome de shock por dengue (SSD) y dengue hemorrágico (DH) vieron una concentración significativamente mayor en el primer grupo, que sería el de mayor gravedad. Además, demostraron que no hubo diferencias significativas al comparar los niveles de CMA-1 en muestras de pacientes infectados con DENV-1, DENV-2 y DENV-3.

Furuta y col. (107) reclutaron pacientes vietnamitas pediátricos con dengue y clasificaron los casos en dengue leve, DH y SSD y hallaron concentraciones significativamente mayores en pacientes que desarrollaron SSD respecto a quienes desarrollaron DH, dengue leve, y también respecto a controles febriles y controles sanos. Pero las diferencias no fueron significativas entre DH y dengue leve.

Respecto a los días de síntomas y los niveles de CMA-1, Sahu y cols. reportaron mejor capacidad predictiva de CMA-1 a partir del día 3 de síntomas, al igual que los estudios liderados por Tissera (108) y Rathore (50), mientras que antes del día 3 no detectaron diferencias entre los grupos de gravedad. En el estudio de Furuta no se mencionan los días de síntomas, sino que se consideró como día cero al día en el que el paciente acudió al centro de atención médica. En el presente trabajo se encontró correlación lineal significativa entre CMA-1 y días de síntomas ( $p=0,0255$ ), y las concentraciones más altas se encontraron en pacientes con tres días de síntomas en adelante (**Figura 4.12**).

Se analizó la frecuencia de niveles detectables entre pacientes con comorbilidades y sin comorbilidades sin encontrarse una asociación entre la comorbilidad y la detección/no detección de CMA-1, por lo que puede presumirse que las altas concentraciones de la enzima en el grupo DG no se deben a la comorbilidad.



Furuta y col., Sahu y col., Tissera y col., Rathore y col., (61,91,107,108) reportaron niveles detectables de CMA-1 en pacientes con dengue leve e incluso en controles sanos. En el presente estudio no se incluyeron controles sanos para CMA-1 pero, en la mayoría de los casos de DSSA no se detectó la proteína (87%). Sobre este punto es importante mencionar que se utilizó la misma técnica que otros estudios (ELISA) y que la sensibilidad del kit utilizado en este trabajo fue de 0,188 ng/mL, el cual es superior a lo que se ha detectado en controles sanos y febriles en los reportes previos. Por tanto, el método utilizado no debería ser la razón de esta discordancia y podrían considerarse otras como diferencias en la población, tales como factores genéticos del huésped dado por polimorfismos del gen de CMA-1, poblaciones diferentes de mastocitos en el huésped, nivel de expresión de receptores en los mastocitos, etc. (109,110).

Otro punto que podría atribuirse a diferencias en la población, son las magnitudes de las concentraciones halladas, que este estudio fueron bastante superiores a lo detectado por otros autores. Por ejemplo, Sahu y col. detectaron concentraciones menores a 5 ng/mL. Rathore y col., mientras que Furuta y col. valores en torno a los 10 ng/mL.

Por otra parte, el diseño de este estudio no permite evaluar el valor predictivo, pero aporta los primeros hallazgos en la población paraguaya sobre el potencial predictor de la CMA-1, respaldado por reportes de otras publicaciones. Esto sirve de base importante para realizar estudios a futuro.

En este trabajo se reportan los primeros datos sobre esta enzima en muestras de pacientes del continente americano, hasta la fecha no se encontraron otros reportes.

Finalmente, los datos obtenidos aportan al rol de los mastocitos en la infección por DENV, sobre todo en los casos graves.

### **5.5 Determinación de LBP**

En este estudio se midieron las concentraciones de LBP en controles sanos y pacientes de dengue con diferentes severidades. El promedio en pacientes con dengue fue mayor que en los CS. Al analizar por grupos, se vio un promedio significativamente mayor en los pacientes DG respecto a todos los demás grupos. No se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios de concentración

de LBP entre los CS y los casos DSSA ni entre DSSA y DCSA, pero se observó una tendencia creciente de concentraciones con el aumento de la severidad de los cuadros (**Figura 4.7**). Esto coincide con el reporte de Van de Weg y col. (111), que en su estudio de diseño transversal con pacientes pediátricos indonesios, encontraron niveles mayores de LBP en pacientes infectados con DENV que en controles sanos. En ese estudio también midieron otras moléculas como LPS cuyos resultados sugieren translocación microbiana en pacientes con dengue. En un estudio posterior, Van de Weg y col. (57) analizaron muestras de pacientes pediátricos y adultos brasileños hallando los mismos resultados para los controles sanos y concentraciones significativamente mayores de LBP en pacientes DG respecto a DCSA.

En otro estudio, el de Yonk y col. en pacientes adultos de Malasia, también hallaron concentraciones significativamente mayores de LBP en los pacientes DG respecto a los clasificados como DCSA y DSSA, pero no entre DCSA y DG. En este último estudio publicaron los promedios de concentraciones en la fase febril, que fueron de 23.860 ng/mL en DSSA, 33.346 ng/mL en DCSA y 35.530 ng/mL en DG (no se incluyeron controles sanos). Comparando estos promedios con los obtenidos en el presente estudio (11.116 ng/mL en DSSA, 13.143 en DCSA y 18.766 en DG) se ve que en ambos casos los promedios aumentan con la severidad, pero la magnitud es diferente, respecto a lo cual no se observa explicación aparente más allá de la menor edad de los pacientes del estudio de Yonk y col. (menores de 35 años), aunque más bien podría atribuirse a las diferencias genéticas propias de pacientes de continentes diferentes. También evaluaron las concentraciones de CD14 soluble y LPS hallando resultados similares a los de LBP, por lo que han sugerido que es posible que la translocación microbiana de lugar a una activación aberrante de monocitos, lo que estaría asociado a la severidad del dengue.

Shyamali y col. (112) en su estudio de cohorte midieron LBP en muestras de pacientes adultos con dengue de Sri Lanka y encontraron diferencias significativas entre las concentraciones en controles sanos y enfermos. Al comparar los casos DH y dengue leve encontraron mayores concentraciones en el primer grupo, pero esto no fue significativo. También observaron que las concentraciones de LPS eran mayores en pacientes con enfermedades atópicas y metabólicas, lo cual puede influir en la severidad de las manifestaciones del dengue.

En este estudio se encontraron niveles significativamente más elevados de LBP al comparar pacientes con comorbilidades respecto a los que no presentaban esta condición (**Figura 4.8**), lo que podría sugerir que las enfermedades de base influyen en el elevamiento de la proteína. Para profundizar en este punto, se realizó un análisis de comparación de medianas de concentraciones de LBP dentro de cada grupo de pacientes, no se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los pacientes con y sin comorbilidades dentro de los grupos DSSA y DG, pero en el grupo DCSA se observó una mediana significativamente mayor en el grupo sin comorbilidades. Los resultados de este análisis podrían indicar que el elevamiento de LBP no está afectado por las comorbilidades.

Existen antecedentes de la utilidad de LBP como marcador de enfermedades metabólicas (112), por ejemplo, en el estudio publicado por González y col. (113) se incluyeron pacientes españoles con y sin enfermedades metabólicas (DM, HTA, obesidad, etc.) detectándose una mediana de concentración de LBP de 6.820 ng/mL en pacientes sin enfermedades de base, que resultó ser significativamente menor que en pacientes con enfermedades metabólicas cuya mediana fue 8.020 ng/mL. En el presente estudio, no fue posible estudiar la asociación entre estas enfermedades y los valores de las concentraciones de LBP ya que la mayoría de los 39 pacientes en los que se midió LBP padecían al menos dos comorbilidades, como se observa en la **Tabla del anexo 9.6**. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que es importante seguir evaluando LBP a fin de determinar su comportamiento en personas con enfermedades crónicas y ver cómo cursa la infección por DENV.

No se encontró una correlación significativa al analizar las concentraciones de LBP por días de síntomas, pero reportes previos indican que sus concentraciones más elevadas se dan durante la fase aguda del dengue, lo cual es esperable al tratarse de una proteína de fase aguda (57,59,60).

Finalmente, las altas concentraciones halladas en el grupo DG se suman a las evidencias de que LBP y, por ende, LPS podrían estar involucrados en la fisiopatología de la infección. Un estudio de cohorte daría más información sobre los días de síntomas en los que es más oportuno medir y su valor predictivo.

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Se analizaron 1.268 muestras para detección del antígeno NS1 de DENV y 1.021 para amplificación del genoma viral por rRT-PCR. A través de estos análisis se confirmaron 508 casos de dengue. La combinación de las dos técnicas mencionadas permitió detectar todos los casos. DENV-4 fue el tipo principalmente detectado, seguido de DENV-1 y DENV-2. También se realizó detección de anticuerpos IgM anti-DENV e IgG anti-DENV en 801 muestras, un bajo porcentaje fue positivo para IgM anti-DENV (15%) y 45% para IgG anti-DENV.
- Se seleccionaron y clasificaron 145 pacientes con dengue en los grupos DSSA, DCSA y DG. No se encontraron diferencias significativas al comparar la viremia entre los grupos.
- Al comparar con los grupos DSSA y DCSA se observaron menores recuentos de plaquetas en los pacientes con DG, también mayor recuento de leucocitos, mayores niveles de creatinina, urea, bilirrubina y fosfatasa alcalina, que se asocian a daño renal y hepático. Todas estas diferencias tuvieron significancia estadística. Estos resultados indican la utilidad de estos parámetros laboratoriales en el seguimiento de pacientes con dengue.
- Se cuantificaron los niveles de LBP en los tres grupos mencionados y en un grupo control, las concentraciones aumentaron conforme el nivel de gravedad en los grupos de dengue. Al cuantificar los niveles de CMA-1, se observó una mayor concentración en el grupo DG. Los hallazgos fueron similares a estudios previos y sugieren la posible utilidad de estas proteínas como marcadores de gravedad.
- Este estudio aporta los primeros datos sobre los niveles de LBP y CMA-1 en la población paraguaya. Deben realizarse estudios a futuro a fin de evaluar el poder predictivo y validar estas proteínas como predictores de gravedad. Esto podría contribuir a disminuir los casos fatales y a direccionar los recursos hospitalarios hacia los pacientes que más lo requieren, sobre todo en casos de epidemias.

## 7. PERSPECTIVAS

Dentro del Proyecto en el que se enmarca este trabajo de tesis, varias de las muestras incluidas serán secuenciadas a fin de realizar una caracterización molecular del virus del DENV. Esto permitirá analizar variaciones genéticas y ver si tienen relación con los casos graves, y/o con otras características descritas.

También se estudiará el perfil de citoquinas de muestras seleccionadas de este estudio, a través de un panel de 17 citoquinas que son:

|                                                                      |                                                                 |                                                  |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)               | Proteína inflamatoria de los macrófagos-1 beta (MIP-1 $\beta$ ) | Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) |
| Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) | Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)                   | Interferón gamma (INF- $\gamma$ )                |
| Interleuquina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )                              | Interleuquina-2 (IL-2)                                          | Interleuquina-4 (IL-4)                           |
| Interleuquina-5 (IL-5)                                               | Interleuquina-6 (IL-6)                                          | Interleuquina-7 (IL-7)                           |
| Interleuquina-8 (IL-8)                                               | Interleuquina-10 (IL-10)                                        | Interleuquina-12 (IL-12)                         |
| Interleuquina-13 (IL-13)                                             | Interleuquina-17A (IL-17A)                                      |                                                  |

Este análisis ampliará el conocimiento generado en este trabajo, dando información sobre otros posibles marcadores de gravedad y sobre la fisiopatología del dengue.

Actualmente se cuenta con muestras de varios días de los pacientes con dengue, y además el reclutamiento de pacientes continúa, por lo que se espera concretar un estudio de cohorte a fin de evaluar el valor predictivo de los marcadores estudiados.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453-65.
2. Organización Panamericana de la salud. PAHO/WHO Data - Casos de dengue [Internet]. 2020. [citado 8 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>
3. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coff LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. 2016;3099(16):1-12.
4. Guzmán Tirado M, Kourí Flores G, Bravo González J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. *REV Cuba MED TROP*. 1999;51(1):5-13.
5. Solomon T, Mallewa M. Dengue and Other Emerging Flaviviruses. *J Infect*. 2001;42(2):104-15.
6. Gould EA, Coutard B, Malet H, Morin B, Jamal S, Weaver S, et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. Vol. 87, *Antiviral Research*. 2010. p. 111-24.
7. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Mol Biol*. 2003;10(11):907-12.
8. Zheng A, Umashankar M, Kielian M. In Vitro and In vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS Pathog*. 2010;6(10).
9. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses*. 2013;6(1):69-88.
10. Kilmer PD. Review Article: Dengue. Current concepts. *Journal Theory, Pract Crit*. 2010;11(3):369-73.
11. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. Vol. 98, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2013. p. 192-208.
12. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, et al. Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors. *J Biol Chem*. 2001;276(49):45762-71.
13. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *J Virol*. 1999;73(4):3108-16.
14. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem*. 2011;286(25):22147-59.

15. Vinet L, Zhedanov A. A «missing» family of classical orthogonal polynomials. *J Phys A Math Theor*. 2011;44(8):1689-99.
16. Tay MYF, Fraser JE, Chan WKK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, et al. Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res*. 2013;99(3):301-6.
17. Spagnolo JF, Rossignol E, Bullitt E, Kirkegaard K. Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *Rna*. 2010;16(2):382-93.
18. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol*. 2008;3(2):155-65.
19. Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2007;7(1):76-85.
20. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. Halstead SB, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(5):e646.
21. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*. 2007;7:1-13.
22. Vogt MB, Lahon A, Arya RP, Kneubehl AR, Spencer Clinton JL, Paust S, et al. Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system. Dinglasan RR, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(5):e0006439.
23. Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the tropism of dengue virus in humans. *Viruses*. 2019;11(12).
24. Duangkhae P, Erdos G, Ryman KD, Watkins SC, Falo LD, Marques ETA, et al. Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2018;138(3):618-26.
25. Troupin A, Shirley D, Londono-Renteria B, Watson AM, McHale C, Hall A, et al. A Role for Human Skin Mast Cells in Dengue Virus Infection and Systemic Spread. *J Immunol*. 2016;197(11):4382-91.
26. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429-35.
27. Fernando S, Wijewickrama A, Gomes L, Punchihewa CT, Madusanka SDP, Dissanayake H, et al. Patterns and causes of liver involvement in acute dengue infection. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):1-9.
28. Roy A, Sarkar D, Chakraborty S, Chaudhuri J, Ghosh P, Chakraborty S. Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children. *N Am J Med Sci*. 2013;5(8):480-5.
29. Samanta J. Dengue and its effects on liver. *World J Clin Cases*. 2015;3(2):125.

30. Salazar MI, Pérez-García M, Terreros-Tinoco M, Castro-Mussot ME, Diegopérez-Ramírez J, Ramírez-Reyes AG, et al. Dengue Virus Type 2: Protein Binding and Active Replication in Human Central Nervous System Cells. *Sci World J.* 2013;2013:1-10.
31. Forshey BM, Reiner RC, Olkowski S, Morrison AC, Espinoza A, Long KC, et al. Incomplete Protection against Dengue Virus Type 2 Re-infection in Peru. Messer WB, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004398.
32. Waggoner JJ, Balmaseda A, Gresh L, Sahoo MK, Montoya M, Wang C, et al. Homotypic Dengue Virus Reinfections in Nicaraguan Children. *J Infect Dis.* 2016;214(7):986-93.
33. Anderson KB, Gibbons R V., Cummings DAT, Nisalak A, Green S, Libraty DH, et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis.* 2014;209(3):360-8.
34. Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, et al. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(6):990-8.
35. Atkins SD, Clark IM, Echavarria M, Sanchez JL, Kolavic-Gray SA, Polyak CS, et al. Current Advances in Dengue. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(4):642–650.
36. Tsang TK, Ghebremariam SL, Gresh L, Gordon A, Halloran ME, Katzelnick LC, et al. Effects of infection history on dengue virus infection and pathogenicity. *Nat Commun.* 2019;10(1):1246.
37. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(3):e88-100.
38. Quirine A, Clapham HE, Lambrechts L, Duong V, Buchy P, Althouse BM, et al. Contributions from the silent majority dominate dengue virus transmission. 2018;82-6.
39. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Dengue: Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control. La Paz, Bolivia; 2009.
40. Yacoub S, Wertheim H, Simmons CP, Screaton G, Wills B. Cardiovascular manifestations of the emerging dengue pandemic. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(6):335-45.
41. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: Guías Para la Atención de Enfermos en la Región de las Américas. 2016. 1-144 p.
42. Kumar S, Iuga A, Jean R. Cardiac tamponade in a patient with dengue fever and lupus nephritis: A case report. *J Intensive Care Med.* 2010;25(3):175-8.
43. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015;385(9966):453-65.
44. Cucunawangsih, Lugito NPH, Kurniawan A. Immunoglobulin G (IgG) to IgM ratio in secondary adult dengue infection using samples from early days of



- symptoms onset. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):1-6.
45. Salje H, Cummings DAT, Rodriguez-Barraquer I, Katzelnick LC, Lessler J, Klungthong C, et al. Reconstruction of antibody dynamics and infection histories to evaluate dengue risk. *Nature.* 2018;557(7707):719-23.
  46. Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(9).
  47. St. John AL, Rathore APS. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(4):218-30.
  48. Zhang B, Salieb-Beugelaar GB, Nigo MM, Weidmann M, Hunziker P. Diagnosing dengue virus infection: Rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. Vol. 11, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* Elsevier B.V.; 2015. 1745-1761 p.
  49. Montecillo-Aguado MR, Montes-Gómez AE, García-Cordero J, Corzo-Gómez J, Vivanco-Cid H, Mellado-Sánchez G, et al. Cross-reaction, enhancement, and neutralization activity of dengue virus antibodies against Zika virus: A study in the Mexican population. *J Immunol Res.* 2019;2019:14.
  50. Rathore APS, St. John AL. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Front Immunol.* 2020;11(02):1-9.
  51. Andreato-Santos R, Pereira SS, Pereira LR, Félix AC, Romano CM, Ferreira LC de S. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. *Int J Infect Dis.* 2020;95:276-8.
  52. WHO. Plataforma de Información en Salud para las Americas - PLISA [Internet]. Dengue. [citado 20 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/549-dengue-serotypes-es.html>
  53. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current Microbiology.* 2021;78(1):17-32.
  54. Morens DM. Antibody-Dependent Enhancement of Infection and the Pathogenesis of Viral Disease. *Clin Infect Dis.* 2019;19(3):500-12.
  55. Dejnirattisai, Wanwisa Jumnainsong, Amonrat Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana, Sirijitt Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda, Thaneeya Supasa, Sunpetchuda Chawansuntati, Kriangkrai Malasit P, et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance. *Science* (80- ). 2010;328(May):745-8.
  56. Chan KR, Ong EZ, Tan HC, Zhang SLX, Zhang Q, Tang KF, et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 is critical for antibody-dependent dengue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2722-7.
  57. van de Weg CAM, Pannuti CS, de Araújo ESA, van den Ham H-J, Andeweg AC, Boas LS V., et al. Microbial Translocation Is Associated with Extensive Immune Activation in Dengue Virus Infected Patients with Severe Disease. Rico-Hesse R, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2236.

58. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
59. van de Weg CAM, Koraka P, van Gorp ECM, Mairuhu ATA, Supriatna M, Soemantri A, et al. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *J Clin Virol.* 2012;
60. Yong YK, Tan HY, Jen SH, Shankar EM, Natkunam SK, Sathar J, et al. Aberrant monocyte responses predict and characterize dengue virus infection in individuals with severe disease. *J Transl Med.* 2017;15(1):1-11.
61. Rathore APS, Senanayake M, Athapathu AS, Gunasena S, Karunaratna I, Leong WY, et al. Serum chymase levels correlate with severe dengue warning signs and clinical fluid accumulation in hospitalized pediatric patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-11.
62. St John AL, Rathore AP, Raghavan B, Ng M-L, Abraham SN. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *Elife.* 2013;2:1-18.
63. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, Van Gorp ECM, et al. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol.* 2003;70(1):91-8.
64. Silva T, Jeewandara C, Gomes L, Gangani C, Mahapatuna SD, Pathmanathan T, et al. Urinary leukotrienes and histamine in patients with varying severity of acute dengue. *PLoS One.* 2021;16(2 February):1-18.
65. Jing Q, Wang M. Dengue epidemiology. *J Glob Health.* 2019;3(2):1-45.
66. World Health Organization (WHO). Treatment, prevention and control global strategy for dengue prevention and control. Geneva, Suiza; 2012.
67. Wilder-Smith A, Ooi E, Horstick O, Wills B. Dengue. *Lancet.* 2019;393(10169):350-63.
68. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(8):935-41.
69. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Boletín epidemiológico. Vol. 51. Asunción; 2018.
70. Lam PK, Tam DTH, Diet TV, Tam CT, Tien NTH, Kieu NTT, et al. Clinical Characteristics of Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children: A 10-Year Prospective Study in a Single Hospital. *Clin Infect Dis.* 2013;57(11):1577-86.
71. Tomashek KM, Gregory CJ, Rivera Sánchez A, Bartek MA, Garcia Rivera EJ, Hunsperger E, et al. Dengue Deaths in Puerto Rico: Lessons Learned from the 2007 Epidemic. Guzman MG, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1614.
72. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(4):271-81.
73. Pang J, Lindblom A, Tolfvenstam T, Thein TL, Naim ANM, Ling L, et al. Discovery and validation of prognostic biomarker models to guide triage among adult dengue patients at early infection. *PLoS One.* 2016;11(6):1-19.

74. Cantero C, Cardozo F, Waggoner JJ, Pinsky BA, Espínola A, Infanzón B, et al. Implementation of a multiplex RRT-PCR for Zika, chikungunya, and dengue viruses: Improving arboviral detection in an endemic region. *Am J Trop Med Hyg.* 102(3):625-8.
75. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJV, Tellez Y, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1295-7.
76. Weber C, Hartig A, Hartmann RK, Rossmanith W. Playing RNase P Evolution: Swapping the RNA Catalyst for a Protein Reveals Functional Uniformity of Highly Divergent Enzyme Forms. Zhang J, editor. *PLoS Genet.* 2014;10(8):e1004506.
77. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Development of an internally controlled real-time reverse transcriptase PCR assay for pan-dengue virus detection and comparison of four molecular dengue virus detection assays. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2172-81.
78. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. Morrison AC, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2116.
79. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dengue: Guía de Manejo Clínico [Internet]. 2012 [citado 23 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.paho.org/par/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=publicaciones-con-contrapartes&alias=389-dengue-guia-de-manejo-clinico&Itemid=253](https://www.paho.org/par/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-con-contrapartes&alias=389-dengue-guia-de-manejo-clinico&Itemid=253)
80. WEB D.G.V.S. [Internet]. ARBOVIROSIS. [citado 29 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://dgvs.mspbs.gov.py/page/#arbovirosis.html>
81. Bogado F, Leite C, Noguera L, Noguera C, Nuñez C, Soares-Almeida M, et al. Epidemiological situation of Dengue in the city of Encarnación 2018. *Rev del Inst Med Trop.* 2020;15(1):12-20.
82. Rojas A, Aria L, de Guillén Y, Acosta ME, Infanzón B, Díaz V, et al. Clinical, hematological and serological profile in suspected dengue patients at IICS-UNA, 2009-2013. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud.* 2016;14(2):68-74.
83. Flores L, Díaz Duba S, Torales J, Agüero R, Román L, Adorno J, et al. Características clínicas de la epidemia de dengue en el servicio de urgencias del Hospital de Clínicas. *Rev Salud Pública Parag.* 2016;6(2):16-21.
84. Cardozo-Segovia FM, Rojas-Segovia AM, Franco L, Herebia L, Vallejos MA, Páez-Acchiardi GM, et al. Search of flavivirus in individuals with clinical suspicion of dengue and negative for the NS1 antigen in Paraguay. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud.* 2017;15(1):7-15.
85. Garg A, Garg J, Rao YK, Upadhyay GC, Sakhuja S. Prevalence of dengue among clinically suspected febrile episodes at a teaching hospital in North India.

- J Infect Dis Immun. 2011;3(5):85-9.
86. Murugananthan K, Kandasamy M, Rajeshkannan N, Noordeen F. Demographic and clinical features of suspected dengue and dengue haemorrhagic fever in the Northern Province of Sri Lanka, a region afflicted by an internal conflict for more than 30 years-a retrospective analysis. *Int J Infect Dis.* 2014;27:32-6.
  87. Karoli R, Fatima J, Siddiqi Z, Kazmi KI, Sultania AR. Clinical profile of dengue infection at a teaching hospital in North India. *J Infect Dev Ctries.* 2012;6(7):551-4.
  88. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección de Vigilancia de Enfermedades Crónicas no Transmisibles. Análisis de la situación de las enfermedades crónicas no transmisibles. Asunción; 2014.
  89. Nunes PCG, de Filippis AMB, Lima MQ da R, Faria NR da C, de Bruycker-Nogueira F, Santos JB, et al. 30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):346.
  90. Mallhi TH, Khan AH, Sarrieff A, Adnan AS, Khan YH. Determinants of mortality and prolonged hospital stay among dengue patients attending tertiary care hospital: A cross-sectional retrospective analysis. *BMJ Open.* 2017;7(7):1-12.
  91. Sahu AK, Aggarwal P, Ekka M, Nayer J, Bhoi S, Kumar A, et al. Assessing the serum chymase level as an early predictor of dengue severity. *J Med Virol.* 2020;(April):1-8.
  92. Vázquez Cynthia, Villalba Shirley, Gamarra Maria Liz, Elva Oviedo, Angelica Oviedo, Maria Jose Ortega, Carmen Arellano, Wilson Paredes, Sonia Figueredo, Luis Ramirez, Juan Torales, Pamela Dunjo, Karen Nielsen, Jose Pereira MC. Características Viroológicas y Serológicas de Pacientes con Dengue Grave y Fallecidos por Dengue durante la Epidemia del Año 2011 en Paraguay. *Rev Inst Med Trop.* 2012;7(1).
  93. Sigera PC, Amarasekara R, Rodrigo C, Rajapakse S, Weeratunga P, De Silva NL, et al. Risk prediction for severe disease and better diagnostic accuracy in early dengue infection; The Colombo dengue study. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1-8.
  94. Aldama F, Montiel-Jarolín D, Real R. Mortality during an outbreak of dengue 2012-2013. *17-Rev Nac.* 2015;7(1).
  95. Lovera D, Martínez-Cuellar C, Galeano F, Amarilla S, Vazquez C, Arbo A. Clinical manifestations of primary and secondary dengue in Paraguay and its relation to virus serotype. *J Infect Dev Ctries.* 2019;13(12):1127-34.
  96. Nunes PCG, de Filippis AMB, Lima MQ da R, Faria NR da C, de Bruycker-Nogueira F, Santos JB, et al. 30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):346.
  97. Rico-Hesse R. Dengue Virus Virulence and Transmission Determinants. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer, Berlin, Heidelberg;

2010. p. 45-55.

98. Talarico LB, Byrne AB, Amarilla S, Lovera D, Vázquez C, Chamorro G, et al. Characterization of type I interferon responses in dengue and severe dengue in children in Paraguay. *J Clin Virol*. 2017;97:10-7.
99. Rojas A, Cardozo F, Cantero C, Stittleburg V, López S, Bernal C, et al. Characterization of dengue cases among patients with an acute illness, Central Department, Paraguay. *PeerJ*. 2019;2019(10):1-20.
100. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. *Virology*. 2003;305(2):330-8.
101. Guzman M, Gubler D, Izquierdo A, Martínez E HS. Dengue infections. *Challenges Infect Dis*. 2016;2:301-11.
102. Tuan NM, Nhan HT, Van Vinh Chau N, Hung NT, Tuan HM, Van Tram T, et al. An evidence-based algorithm for early prognosis of severe dengue in the outpatient setting. *Clin Infect Dis*. 2017;64(5):656-63.
103. World Health Organization (WHO) Regional Office for South-East Asia. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2009.
104. Thein T, Leo Y, Fisher DA, Low JG, Oh HML, Gan VC, et al. Risk Factors for Fatality among Confirmed Adult Dengue Inpatients in Singapore : A Matched Case-Control Study. 2013;8(11):1-6.
105. Ferede G, Tirunch M, Abate E, Wondimeneh Y, Gadisa E, Howe R, et al. A study of clinical, hematological, and biochemical profiles of patients with dengue viral infections in Northwest Ethiopia: Implications for patient management. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):1-6.
106. Lovera D, Martínez-Cuellar C, Galeano F, Amarilla S, Vazquez C, Arbo A. Clinical manifestations of primary and secondary dengue in Paraguay and its relation to virus serotype. *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(12):1127-34.
107. Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, et al. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2).
108. Tissiera H, Rathore APS, Leong WY, Pike BL, Warkentien TE, Farouk FS, et al. Chymase Level Is a Predictive Biomarker of Dengue Hemorrhagic Fever in Pediatric and Adult Patients. *J Infect Dis*. 2017;216(9):1112-21.
109. Rathore AP, St John AL. Protective and pathogenic roles for mast cells during viral infections. *Curr Opin Immunol*. 2020;66:74-81.
110. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(4):253-69.
111. van de Weg CAM, Koraka P, van Gorp ECM, Mairuhu ATA, Supriatna M, Soemantri A, et al. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *J Clin Virol*.

2012;53(1):38-42.

112. Shyamali N. A, Mahaputuna S, Gomes L, Wijewickrama A, Ogg G, Malavige G. The association of lipopolysaccharide and inflammatory markers with severe dengue infection. 2019;1-25.
113. Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F. Determinants of Serum Concentrations of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) in the Adult Population: The Role of Obesity. PLoS One. 2013;8(1):1-8.
114. Center for Disease Control. World Health Organization. Protocol of realtime RTPCR for influenza A ( H1N1 ). Vol. 1. Atlanta; 2009.

## 9. ANEXOS

**9.1 Anexo 1:** Encuesta utilizada para colecta de datos demográficos y clínicos durante el reclutamiento de pacientes.

| <b>Cuestionario de la Visita de Aguda</b>                                                                                                                               | <b>Código Paciente</b>                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Fecha toma de muestra:</b> ____/____/____ (día/mes/año)                                                                                                              |                                                  |
| <b>Sitio Clínico:</b> <input type="checkbox"/> IPS <input type="checkbox"/> HNI <input type="checkbox"/> Otros                                                          |                                                  |
| <b>Información</b>                                                                                                                                                      |                                                  |
| <b>Nombre</b> _____                                                                                                                                                     |                                                  |
| <b>Número de cédula:</b> _____ <b>Sexo:</b> M / F                                                                                                                       |                                                  |
| <b>Número de teléfono:</b> _____                                                                                                                                        |                                                  |
| <b>otro teléfono (pariente/vecino):</b> _____                                                                                                                           |                                                  |
| <b>Nombre</b> _____                                                                                                                                                     |                                                  |
| <b>Parentesco:</b> _____                                                                                                                                                |                                                  |
| <b>Fecha de nacimiento:</b> ____/____/____ (día/mes/año)                                                                                                                |                                                  |
| <b>Edad:</b> _____                                                                                                                                                      |                                                  |
| <b>¿Dónde vive?</b>                                                                                                                                                     | <b>Ubicación GPS</b><br><input type="checkbox"/> |
| <b>Barrio y Ciudad:</b> _____ / _____                                                                                                                                   |                                                  |
| <b>Departamento:</b> _____                                                                                                                                              |                                                  |
| <b>Dirección: (Descripción o referencia):</b> _____                                                                                                                     |                                                  |
| <b>¿Está embarazada?</b> <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí: Semanas o meses de gestación: _____                                                   |                                                  |
| <b>¿Presenta alguna de estas enfermedades diagnosticadas previamente?</b>                                                                                               |                                                  |
| <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus <input type="checkbox"/> Hipertensión <input type="checkbox"/> Enfermedad renal crónica                                      |                                                  |
| <input type="checkbox"/> Enfermedad cardíaca <input type="checkbox"/> Ninguna <input type="checkbox"/> Otro: _____                                                      |                                                  |
| <b>¿En qué tipo de residencia vive (marque uno)?</b>                                                                                                                    |                                                  |
| <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Apartamento <input type="checkbox"/> Otro: _____                                                                 |                                                  |
| <b>¿Es un asentamiento?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                                                     |                                                  |
| <b>¿Hay algún baldío, plaza o casa abandonada (a &lt;100m)</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                  |                                                  |
| <b>¿Las ventanas tienen tela metálica/anti-mosquitos?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                       |                                                  |
| <b>¿Tiene aire acondicionado en su residencia?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                              |                                                  |
| <b>¿Tiene agua corriente en su residencia?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                                  |                                                  |
| <b>¿Guarda el agua en contenedores/tambores/tanque elevado?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                 |                                                  |
| <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> con tapa    <input type="checkbox"/> sin tapa</div>                                                            |                                                  |
| <b>¿En el último mes, ha viajado fuera de la ciudad donde vive?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                             |                                                  |
| <b>¿A dónde?:</b> _____                                                                                                                                                 |                                                  |
| <b>Fecha:</b> _____                                                                                                                                                     |                                                  |
| <b>¿Trabaja o estudia fuera del hogar?</b> <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No                                                                      |                                                  |
| <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Sí    <input type="checkbox"/> No</div>                                                                        |                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Estudia o trabaja al aire libre?</li> </ul>                                                                                      |                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Dónde? Barrio y Ciudad _____ / _____</li> </ul>                                                                                 |                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es su ocupación?: _____</li> </ul>                                                                                         |                                                  |
| <b>¿Ha sido vacunado contra la fiebre amarilla?</b> <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/> Sí. <b>¿En qué año?</b> _____ |                                                  |

**Anexo 1:** Encuesta utilizada para colecta de datos demográficos y clínicos durante el reclutamiento de pacientes (continuación).

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|--|--|--|--|--|--|----------------|--|--|--|--|--|--|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-------|--|-------|--|-------|--|
| ¿Alguna vez tuvo dengue? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Cree que tuvo dengue pero no fue diagnosticado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| <table border="1"> <tr> <td>¿Cuántas veces?</td> <td colspan="6"></td> </tr> <tr> <td>¿Cuándo (año)?</td> <td colspan="6"></td> </tr> <tr> <td>Fue diagnosticado por un médico?</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> </tr> <tr> <td>Tuvo alguna prueba de dengue positiva por laboratorio</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> </tr> <tr> <td>Fue internado</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> <td><input type="checkbox"/> Sí</td> <td><input type="checkbox"/> No</td> </tr> <tr> <td>Síntomas:</td> <td colspan="2">Lista</td> <td colspan="2">Lista</td> <td colspan="2">Lista</td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                             |                             |                             |                             |                             |                             | ¿Cuántas veces? |  |  |  |  |  |  | ¿Cuándo (año)? |  |  |  |  |  |  | Fue diagnosticado por un médico? | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | Tuvo alguna prueba de dengue positiva por laboratorio | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | Fue internado | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | Síntomas: | Lista |  | Lista |  | Lista |  |
| ¿Cuántas veces?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| ¿Cuándo (año)?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| Fue diagnosticado por un médico?                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| Tuvo alguna prueba de dengue positiva por laboratorio                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| Fue internado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| Síntomas:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Lista                       |                             | Lista                       |                             | Lista                       |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| ¿Alguien en su familia o en su trabajo tuvo o tiene dengue?<br><input type="checkbox"/> Sí ¿Cuándo? _____<br><input type="checkbox"/> No                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |
| <b>Ficha de Datos Clínicos</b> - a completar por el personal del estudio<br><b>¿Tuvo alguno de los siguientes síntomas en los últimos 7 días?</b><br><br>- Fiebre <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>- Fecha de inicio: ____/____/____ (día/mes/año)<br>- Temperatura más alta: ____°C <input type="checkbox"/> No se midió pero se sintió febril<br><br>- Ojos rojos o conjuntivitis <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>- Fecha de inicio: ____/____/____<br><br>- Rash (erupciones, ronchas) <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>- Fecha de inicio: ____/____/____<br><br>- Dolor en las articulaciones, en más de una articulación <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>- Dolor muscular difuso o en todo el cuerpo <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br><br><b>En los últimos 7 días, ¿tuvo además otros síntomas?</b><br>Dolor de cabeza <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Decaimiento <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Dolor retro-ocular <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Tos <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Dificultad para respirar <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Dolor de espalda (cerca de pulmones) <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Dolor de garganta <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Náuseas <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Vómitos <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Diarrea <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br><br>Frecuencia: <input type="checkbox"/> 1 a 5 veces por día<br><input type="checkbox"/> Más de 5 veces por día<br><br>Hinchazón/Edema <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br>Ubicación de la hinchazón: _____<br>Sangrado <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No<br><br>Ubicación del sangrado: <input type="checkbox"/> Nariz<br><input type="checkbox"/> Encías<br><input type="checkbox"/> Otros: _____<br><b>¿Cuál fue el primer síntoma que notó?</b> _____<br><b>Fecha de inicio síntomas:</b> ____/____/____ (día/mes/año) |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                 |  |  |  |  |  |  |                |  |  |  |  |  |  |                                  |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                                                       |                             |                             |                             |                             |                             |                             |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |           |       |  |       |  |       |  |



## **9.2 Anexo 2: Formularios de consentimiento informado**

### **9.2.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado por escrito.**

#### **Se le está pidiendo que participe en un estudio de investigación**

##### **¿Qué es un estudio de investigación?**

El objetivo de los estudios de investigación es adquirir conocimientos. Este conocimiento puede usarse para ayudar a otros. Los estudios de investigación por lo general no ofrecen beneficiar a alguien directamente, aunque algunos podrían.

##### **¿Tengo que estar de acuerdo con esto?**

**No. Estar en este estudio es enteramente su elección. Si decide unirse a este estudio, puede cambiar de opinión en cualquier momento y retirarse del estudio de investigación.**

Participar en un estudio es independiente de la atención médica. La decisión de unirse o no al estudio de investigación no afectará su atención médica de ninguna manera.

##### **¿Qué es este documento?**

Este formulario es un documento de consentimiento informado. Describirá los procedimientos del estudio y cualquier riesgo para usted.

Firmar este formulario indica que está dispuesto a participar en el estudio y permitir que se utilice la información acerca de su salud.

##### **¿Qué debería hacer después?**

1. Lea este formulario o pida a alguien que lo lea para usted.
2. Asegúrese de que el personal del estudio le explique el estudio.
3. Haga cualquier pregunta que tenga acerca del compromiso de tiempo, palabras desconocidas, procedimientos específicos o cualquier otra duda acerca de este formulario.
4. Tómese el tiempo para considerar esto y hablar de ello con su familia y amigos.

### 9.2.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado por escrito (continuación)

#### Consentimiento para ser un Participante en la Investigación

**Título: Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Departamento Central, Paraguay**

**Investigadores:**

Alejandra Rojas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Jesse Waggoner, Universidad de Emory, Atlanta, Georgia, EE.UU.

*Si usted es el tutor legal de un niño/a al que se le pide que participe, el término "usted" usado en este consentimiento se refiere a su hijo/a.*

**Fuente de financiamiento:** Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.

**Introducción**

**Participar en este estudio es enteramente su elección. Usted puede cambiar de opinión y retirarse del estudio de investigación en cualquier momento.** La decisión de unirse o no al estudio de investigación no afectará su atención médica de ninguna manera. Puede conservar una copia de este formulario de consentimiento. No firme este formulario a menos que haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y obtener respuestas que tengan sentido para usted. Al firmar este formulario, no renunciará a ningún derecho legal.

**¿Cuál es el propósito de este estudio?**

El dengue es una enfermedad que afecta a muchas personas en Paraguay. Sin embargo, muchas otras enfermedades causan síntomas similares al dengue, como Zika, chikungunya y fiebre amarilla. Esto hace que sea difícil diagnosticar a los pacientes con dengue o una de estas enfermedades similares. En este estudio planeamos incluir 200 pacientes por año para evaluar nuevas pruebas para dengue, Zika, chikungunya y otros virus con el fin de estudiar estas infecciones virales en pacientes en Paraguay.

**¿Qué se me pedirá que haga?**

Se le pedirá que proporcione muestras de sangre y orina en dos momentos: hoy y 2-4 semanas a partir de hoy. Recogeremos dos tubos (niños) o tres tubos (adultos) de sangre hoy y en 2-4 semanas a partir de hoy. Se le pedirá que complete un cuestionario hoy y cuando regrese en 2-4 semanas. Si está de acuerdo, le pediremos que nos envíe la ubicación de su hogar y lugar de trabajo o escuela usando su teléfono celular. Puede elegir no proporcionar esta información. Después de completar todas las pruebas solicitadas por su médico, es posible que recolectemos las muestras sobrantes del laboratorio, como líquido cefalorraquídeo (LCR), suero o sangre total. Si necesita ser internado en el hospital, es probable que tenga que realizarse análisis para control y seguimiento, en estas oportunidades conservaremos una parte su muestra o recolectaremos el remanente del laboratorio.

**SUBESTUDIO OPCIONAL: Uso de sangre en papel de filtro para el diagnóstico de infecciones por arbovirus en adultos.** Si acepta participar, tomaremos una pequeña muestra de sangre con un pinchazo simple en el dedo (como revisar el azúcar en la sangre) en esta visita y en 2-4 semanas. El procedimiento de pinchazo del dedo es bien tolerado. Puede tener un poco de dolor en el dedo.

**¿Cuáles son los posibles riesgos y molestias?**

Habrà una cantidad mínima de riesgo. Puede experimentar un poco de dolor o moretones en el sitio de la extracción de sangre. Existe un riesgo muy bajo de infección.

**¿Me beneficiaré directamente del estudio?**

Este estudio no está diseñado para beneficiarte directamente. Los resultados del estudio pueden usarse para ayudar a otros en el futuro si presentan una enfermedad similar.

### 9.2.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado por escrito (continuación)

#### **¿A quién pertenece la información y las muestras de mi estudio?**

Si se une a este estudio, donará sus muestras y la información para el estudio. Usted no recibirá ninguna compensación si sus muestras o información se utilizan para hacer un nuevo producto. Si usted se retira del estudio, los datos y las muestras que ya fueron recogidos pueden todavía ser utilizados para este estudio.

#### **¿Seré compensado por mi tiempo y esfuerzo?**

Proporcionaremos el reembolso de los gastos de viaje, hasta un máximo de 30.000 guaraníes (\$ 4.78 USD) para presentarse a la visita a las 2-4 semanas. La compensación sólo se proporcionará al presentarse para la segunda visita.

#### **¿Cómo protegerá mi información privada que recoja en este estudio?**

Se le asignará un código de estudio único, que se usará en los registros del estudio en lugar de su nombre. La información que puede identificarlo personalmente se almacenará en una base de datos informática bloqueada a la que solo podrán acceder un número limitado de investigadores en Paraguay. Ciertas oficinas y personas que sirven para proteger a los participantes en estudios de investigación pueden revisar los registros del estudio para garantizar su protección. En particular, los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los EE.UU. y la Oficina de Protección de Investigaciones Humanas de los EE. UU. (OHRP) pueden acceder a los datos del estudio.

#### **Almacenar y compartir su información**

*Sus muestras, las respuestas a los cuestionarios y los resultados de las pruebas de laboratorio se almacenarán y compartirán con el equipo de investigación de nuestro estudio. Sus muestras codificadas (sin su nombre) pueden enviarse a laboratorios en otros países para pruebas especiales y almacenamiento. Sus muestras y datos se almacenarán de forma indefinida y pueden compartirse con otros investigadores para proyectos que hayan sido revisados y aprobados por un Comité de Ética.*

#### **Certificado de Información Confidencial**

El Departamento de Salud y Servicios Humanos (HHS) ha emitido un Certificado de Confidencialidad para proteger aún más su privacidad. Esto evita la divulgación a cualquier persona en los Estados Unidos que no esté relacionada con la investigación.

#### **Historial médico**

Registraremos información de su expediente médico, incluyendo los resultados de las pruebas diagnósticas y los resultados del examen físico.

#### **Costos y Retirada del Estudio-**

***No habrá costos por participar en este estudio.*** Tiene derecho a dejar un estudio en cualquier momento.

#### **Información de contacto**

Contactar con Alejandra Rojas, Departamento de Producción al **0981- 781234** si tiene alguna pregunta acerca de este estudio o su participación en él.

---



---

### 9.2.1 Hoja de información y formulario de consentimiento informado por escrito (continuación)

#### **PARA LLENARLO POR EL PACIENTE SOLAMENTE**

##### **Consentimiento para subestudio opcional**

**Título: Uso de sangre en papel de filtro para el diagnóstico de infecciones por arbovirus en adultos.**

Consiento voluntariamente en participar en este subestudio opcional y entiendo que puedo retirarme por separado de esta parte del estudio en cualquier momento.

\_\_\_\_\_ **Iniciales del Participante (debe tener 18 años o más y poder dar su consentimiento)**

He leído la información en este formulario, o se me ha leído. He tenido la oportunidad de hacer preguntas al respecto, y todas las preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Consiento voluntariamente en participar en esta investigación y cualquier subestudios opcionales marcados arriba. Comprendo que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento. Por favor escriba su nombre, firma y fecha si usted está de acuerdo en participar en el estudio. Al firmar este formulario de consentimiento, usted no renunciará a ninguno de sus derechos legales. Si usted quisiera, le daremos una copia del formulario para guardar.

\_\_\_\_\_ **Nombre y Apellido del Participante**

\_\_\_\_\_ **Código del estudio**

\_\_\_\_\_ **Firma del Participante (18 años o más y capaz de consentir)**

\_\_\_\_\_ **Fecha**

\_\_\_\_\_ **Hora**

\_\_\_\_\_ **Firma del Representante Legalmente Autorizado con autoridad para las decisiones de investigación**

\_\_\_\_\_ **Fecha**

\_\_\_\_\_ **Hora**

\_\_\_\_\_ **Autoridad del Representante Legalmente Autorizado o Relación con el Participante**

#### **PARA LLENAR SOLAMENTE EL EQUIPO DE ESTUDIO**

\_\_\_\_\_ **Nombre y apellido de la persona que realiza el consentimiento informado**

\_\_\_\_\_ **Firma de la persona que realiza el consentimiento informado**

\_\_\_\_\_ **Fecha**

\_\_\_\_\_ **Hora**

Necesita \_\_\_\_\_ o no necesita \_\_\_\_\_ un documento de asentimiento separado.

## 9.2.2 Hoja de información consentimiento informado.

---

### Documento de Asentimiento

---

**Título: “Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Departamento Central, Paraguay”.**

**Investigadores principales:**

Alejandra Rojas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Jesse Waggoner, Universidad de Emory, Atlanta, Georgia, EE.UU.

**INFORMACIÓN SOBRE ESTE ESTUDIO:**

**¿Por qué se le pide que participe en este estudio?**

Estamos estudiando la frecuencia con que ciertos virus, como el virus del dengue y otros virus similares, causan los síntomas que está teniendo hoy. Para ello, necesitamos muestras de sangre y/o de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con síntomas como los suyos para saber qué tan comunes son estos virus y quiénes son los más afectados, para que podamos ayudar a prevenir estas infecciones en el futuro.

**¿Por qué tiene lugar este estudio?**

Este estudio nos ayudará a encontrar mejores pruebas para detectar estos virus y a entender los tipos de enfermedades que causan en Paraguay. Esto puede ayudar a los pacientes en el futuro a recibir mejor y más rápido cuidado médico y también puede ayudar con los intentos de disminuir estas infecciones en Paraguay.

**¿Qué le sucederá si participa en el estudio?**

La participación en este estudio es totalmente *opcional y voluntaria*. Ser parte de este estudio no afectará la atención médica que reciba por su enfermedad. Si acepta participar, hoy se le tomará una muestra de sangre. Se le pedirá que si puede, regrese para una segunda visita en 2-3 semanas para tomar una muestra de sangre. Esto servirá para hacer estudiar la evolución de la enfermedad y cómo responde su sistema inmune (sus defensas).

Después de completar todas las pruebas solicitadas por su médico, es posible que recolectemos las muestras sobrantes del laboratorio, como líquido cefalorraquídeo (LCR), suero o sangre total. También le pediremos a usted o a un adulto que esté con usted que responda algunas preguntas hoy y cuando regrese en la segunda visita.

**¿Alguna parte del estudio causará dolor?**

Las muestras de sangre solo implicarán una extracción de sangre típica, pero pueden causar algo de dolor.

**¿Alguna parte del estudio me hará sentir incómodo?**

Este estudio no debe hacerle sentir incómodo.

**¿A quién puede preguntar si tiene alguna pregunta sobre este formulario?**

Puede hacer preguntas a la persona que le dio este formulario.

**¿Puede cambiar su opinión sobre participar del estudio en cualquier momento?**

La participación en este estudio es su elección y usted puede cambiar de opinión y dejar el estudio en cualquier momento.

**¿Tiene que estar en este estudio incluso si no quiere?**

No. Ser parte de este estudio es su elección.

### 9.2.2 Formulario de asentimiento informado por escrito (continuación)

#### Documento de Asentimiento

Código del estudio

**Título:** *"Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Departamento Central, Paraguay"*.

#### Investigadores principales:

Alejandra Rojas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de

Asunción, Paraguay

Jesse Waggoner, Universidad de Emory, Atlanta, Georgia, EE.UU.

**Fuente de financiamiento:** Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.

- Esta página debe ser llenada por el equipo de investigación en caso de que el paciente sea **menor de 18 años de edad**.

- Este documento **debe estar acompañado del Consentimiento informado**, firmado por los padres o responsable del menor de edad.

**Edad del participante:** \_\_\_\_ años (Si el niño es menor de **6 años** de edad, el asentimiento **no es necesario**.)

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_.

**Número de Cédula de Identidad:** \_\_\_\_\_

#### Marque una casilla:

☐

**Este niño tiene de 6 a 10 años** - debe obtener el asentimiento **verbal** del participante (la firma no es requerida)

\_\_\_\_\_  
Firma de la persona que solicita el asentimiento

\_\_\_\_\_  
Fecha

Hora

☐

**Este niño tiene de 11 a 17 años** - Si acepta participar en este estudio, el niño debe **firmar con su nombre abajo**.

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante de 11 a 17 años

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Hora

☐

En mi opinión, este niño es incapaz de proporcionar asentimiento informado por razones no relacionadas con la edad, y un investigador para este estudio ha sido informado de esta determinación.

- Razón o razones:

\_\_\_\_\_

### 9.2.3 Hoja de información para consentimiento verbal

**Consentimiento verbal para ser un Participante en la Investigación**  
**Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Departamento Central, Paraguay**

**Investigadores:** Alejandra Rojas, IICS-UNA, Paraguay; Jesse Waggoner, Universidad de Emory, EE.UU.

**Fuente de financiamiento:** Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.

**Introducción**

Gracias por su interés en nuestro estudio de investigación. Nos gustaría informarle sobre el estudio antes de que usted decida si quiere participar del mismo. Su participación es voluntaria, no tiene costo y su decisión no afectará su atención médica. Puede retirarse del estudio en cualquier momento si cambia de opinión.

- 1) El propósito de este estudio es evaluar nuevas pruebas para dengue, Zika, chikungunya y otros virus con el fin de estudiar estas infecciones en Paraguay.
- 2) Este estudio está financiado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.
- 3) Si acepta participar, le solicitamos permiso para utilizar las muestras restantes que se tomaron durante su reciente visita al hospital. Estos pueden incluir sangre, orina y líquido cefalorraquídeo. Le pediremos que, si puede, regrese en 2-3 semanas para proporcionar una segunda muestra de sangre. En ese momento, también se le pedirá que firme un documento de consentimiento.
- 4) No hay riesgos en permitirnos usar muestras que usted ya proporcionó. Si decide regresar para una segunda visita, habrá una extracción de sangre que podría causar dolor y moretones.
- 5) Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente, pero los resultados del estudio pueden usarse para ayudar a otros en el futuro.
- 6) Para proteger su información privada, sus muestras, las respuestas de los cuestionarios y los resultados de las pruebas de laboratorio se almacenarán de forma confidencial. Se le asignará un código que se utilizará en los registros del estudio en lugar de su nombre. La información que puede identificarle se almacenará en una base de datos informática bloqueada a la que solo podrán acceder un número limitado de investigadores en Paraguay.
- 7) Sus muestras podrán ser enviadas a laboratorios en otros países para pruebas especiales y almacenamiento. Cualquier información y muestras que se compartan serán manejadas con códigos para proteger su confidencialidad.
- 8) Sus muestras y datos se almacenarán de forma indefinida y pueden compartirse con otros investigadores para proyectos que hayan sido revisados y aprobados por un Comité de Ética.
- 9) El Departamento de Salud y Servicios Humanos (HHS) ha emitido un Certificado de Confidencialidad para proteger aún más su privacidad. Esto evita la divulgación de datos a cualquier persona en los Estados Unidos que no esté relacionada con la investigación.

**Información de contacto**

Si tiene preguntas sobre este estudio, puede comunicarse con Alejandra Rojas, al 0981-781234

**9.2.3** Formulario de consentimiento verbal (continuación)

Código del estudio

**Consentimiento**

¿Tiene alguna pregunta sobre la explicación que le di? ¿Hay algo que no está claro?

¿Acepta participar en el estudio?

El paciente está de acuerdo en participar:    Sí    ☐    ☐    No

Si el participante acepta participar, registrar los siguientes datos:

\_\_\_\_\_  
Nombre del participante

\_\_\_\_\_  
Número de Cédula de Identidad

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legalmente autorizado

\_\_\_\_\_  
Relación del representante legalmente autorizado con el participante

-----

\_\_\_\_\_  
Firma de la persona que solicita el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Hora

\_\_\_\_\_  
Nombre de la persona que solicita el consentimiento



### 9.3 Anexo 3: Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en este estudio.

**Tabla anexo 3.1:** Cebadores que se incluyeron en el ensayo ZCD (Waggoner y col., 2016)(75). Y=C+T; UTR del inglés región no traducida; nsP2: proteína no estructural 2; NS4B: proteína no estructural 4B.

| Cebadores                 | Secuencia 5'→3'                      | Ubicación en el genoma* |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| DENV                      |                                      |                         |
| Den1-2-3 F-long           | CAGATCTCTGATGAACAACCAACG             | 86–109 5' UTR-Cápside   |
| Den1 5' R <i>New Down</i> | TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC                | 179–199 5' UTR-Cápside  |
| Den2 F-long C-> T         | CAGATCTCTGATGAATAACCAACG             | 87–110 5' UTR-Cápside   |
| Den2 R2                   | AGTTGACACGCGGTTTCTC                  | 152–171 5' UTR-Cápside  |
| Den2 R2 AG                | AGTCGACACGCGGTTTCTCT                 | 152–171 5' UTR-Cápside  |
| D>en3 F-long C->T         | CAGATTTCTGATGAACAACCAACG             | 85–108 5' UTR-Cápside   |
| Den4 F1                   | GATCTCTGGAAAAATGAAC                  | 81–99 5' UTR-Cápside    |
| Den4 R1                   | AGAATCTCTTCACCAACC                   | 173–190 5' UTR-Cápside  |
| CHIKV                     |                                      |                         |
| Chik_D_F2Y                | CATCTGCACYCAAGTGACCA                 | 2578–2598 nsP2          |
| Chik_D_R2                 | GCGCATTTTGCCTTCGTAATG                | 2654–2674 nsP2          |
| ZIKV                      |                                      |                         |
| Zika F1                   | CAGCTGGCATCATGAAGAA <del>Y</del> C   | 7332–7352 NS4B          |
| Zika R1 T->C              | CACTTGTC <del>C</del> CCATCTTCTTCTCC | 7411–7432 NS4B          |
| Zika R1 C->T              | CACCTGTCCCATCTTTTCTCC                | 7411–7432 NS4B          |

\*Ubicación genómica basada en las secuencias de cepas de referencias: DENV-1 cepa U.S/Hawaii/1944 (código de acceso Gen Bank EU848545.1), DENV-2 cepa Nueva Guinea C (código de acceso Gen Bank AF038403.1), DENV-3 cepa H87 (código de acceso Gen Bank M93130.1) y DENV-4 cepa H241 (código de acceso Gen Bank AY947539.1), CHIKV cepa S27 prototipo Africano (código de acceso Gen Bank AF369024.2), ZIKV cepa MR766-NIID (código de acceso Gen Bank LC002520.1).

**Tabla anexo 3.2:** Sondas incluidas en el ensayo ZCD (Waggoner y col., 2016)(75). Y=C+T. BHQ: *Black Hole Quencher*® (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, EUA).

| Sondas        | Secuencia                    | Ubicación en el genoma | Fluoróforo 5' | Quencher 3'    |
|---------------|------------------------------|------------------------|---------------|----------------|
| DENV          |                              |                        |               |                |
| Sonda A       | CTCGCGCGTT<br>TCAGCATA       | 136-154 5' UTR-Cápside | FAM           | BHQ-1 plu      |
| Sonda B       | CTCTCGCGTT<br>TCAGCATAT      | 13-15 5' UTR-Cápside   | FAM           | BHQ-1 plu      |
| Sonda C       | CTCTCAGGTTT<br>CAGCATATTG    | 135-155 5' UTR-Cápside | FAM           | BHQ-1 plu      |
| Sonda D       | CTCAGCGGT<br>TTCAGCATAT      | 135-153 5' UTR-Cápside | FAM           | BHQ-1 plu      |
| CHIKV         |                              |                        |               |                |
| Chik_D_Probe2 | GCGGTGTACACT<br>GCCTGTGACYGC | Cal Fluor 610          | BHQ-2         | 2614-2637 nsP2 |
| ZIKV          |                              |                        |               |                |
| Zika_Pr1      | CYGTGTGGAT<br>GGAATAGTGG     | Quasar 705             | BHQ-2         | 7355-7373 NS4B |

\*Posición genómica basada en las secuencias de cepas virales de referencia: DENV-1 cepa S/Hawaii/1944 (código de acceso *GenBank* EU848545.1), DENV-2 cepa C Nueva Guinea (código de acceso *GenBank* AF038403.1), DENV-3 cepa H87 (código de acceso *GenBank* M93130.1) y DENV-4 cepa H241 (código de acceso *GenBank* AY947539.1), CHIKV cepa S27 prototipo Africano (código de acceso *GenBank* AF369024.2), ZIKV cepa MR766-NIID (código de acceso *GenBank* LC002520.1).

**Tabla Anexo 3.3:** Cebadores para la detección del gen RNAsaP, utilizado como control interno en la reacción ZCD. Adaptado de WHO, CDC, 2009(114).

| Cebadores              | Secuencia 5'→3'      |
|------------------------|----------------------|
| ARNasaP <i>forward</i> | AGATTGACCTGCGAGCG    |
| ARNasaP <i>reverse</i> | GAGCGGCTGTCTCCACAAGT |

**Tabla anexo 3.4:** Sondas Taqman para la detección del gen RNAsaP, utilizado como control interno en la reacción ZCD. Adaptado de WHO, CDC, 2009(114).

| Sondas                  | Fluoróforo 5' | Quencher 3' |
|-------------------------|---------------|-------------|
| Secuencia 5'→3'         |               |             |
| TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG | FAM           | BHQ-1       |

**Tabla anexo 3.5:** Cebadores utilizados para la reacción de tipificación de DENV. Adaptado de Waggoner y col., 2013.(78)

| Cebadores                      | Secuencia 5'→3'          | Ubicación en el genoma*             |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| DENV-1, 2, 3<br><i>Forward</i> | CAGATCTCTGATGAACAACCAACG | 86-109                              |
| DENV-2 <i>Forward C-&gt;T</i>  | CAGATCTCTGATGAATAACCAACG | 87-110                              |
| DENV-3 <i>Forward C-&gt;T</i>  | CAGATTTCTGATGAACAACCAACG | 85-108                              |
| DENV-4 <i>Forward</i>          | GATCTCTGGAAAAATGAAC      | 81-99                               |
| DENV-1, 3 <i>Reverse</i>       | TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC    | DENV-1: 199-179;<br>DENV-3: 198-178 |
| DENV-2 <i>Reverse</i>          | AGTTGACACGCGGTTTCTCT     | 171-152                             |
| DENV-2 <i>Reverse A-&gt;G</i>  | AGTCGACACGCGGTTTCTCT     | 171-152                             |
| DENV-4 <i>Reverse</i>          | AGAATCTCTTCACCAACC       | 190-173                             |

\*Las ubicaciones genómicas están basadas en secuencias virales de referencia: DENV-1, US/Hawaii/1944 (*GenBank*: EU848545.1); DENV-2, Nueva Guinea Cepa C (*GenBank*: AF038403.1); DENV-3, cepa H87(*GenBank*: M93130.1); DENV-4, cepa H241 (*GenBank*: AY947539.1).

**Tabla anexo 3.6:** Sondas utilizadas la reacción de tipificación de DENV. Adaptado de Waggoner y col., 2013.(78)

| Sondas | Secuencia 5'→3'                       | Fluoróforo 5'        | Quencher 3' |
|--------|---------------------------------------|----------------------|-------------|
| DENV-1 | CGCGATCGCGTTTCAGCATATTGAAAGACGGATCGCG | FAM                  | BHQ-1       |
| DENV-2 | CGCGATCGCGTTTCAGCATATTGAAAGGCGGATCGCG | CAL Fluor Orange 560 | BHQ-1       |
| DENV-3 | CGCGATCCACGCGTTTCAGCATATTGATAGGATCGCG | CAL Fluor Red 610    | BHQ-2       |
| DENV-4 | CGCGATCTTCAGCATATTGAAAGGTGGTCGATCGCG  | Quasar 670           | BHQ-2       |

#### 9.4 Anexo 4. Procedencia por ciudad del Departamento Central de pacientes con sospecha de dengue.

Tabla anexo 4.1.

| Ciudad               | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa |
|----------------------|---------------------|---------------------|
| Villa Elisa          | 142                 | 13,30%              |
| Luque                | 134                 | 12,60%              |
| San Lorenzo          | 119                 | 11,10%              |
| Ñemby                | 114                 | 10,70%              |
| Limpio               | 88                  | 8,20%               |
| Capiatá              | 76                  | 7,10%               |
| Fernando de la Mora  | 69                  | 6,50%               |
| Lambaré              | 68                  | 6,40%               |
| Mariano Roque Alonso | 58                  | 5,40%               |
| San Antonio          | 37                  | 3,50%               |
| Ypané                | 30                  | 2,80%               |
| Areguá               | 29                  | 2,70%               |
| Itauguá              | 19                  | 1,80%               |
| Sin datos            | 19                  | 1,80%               |
| J. A. Saldivar       | 13                  | 1,20%               |
| Zeballos Cué         | 13                  | 1,20%               |
| Loma Pyta            | 12                  | 1,10%               |
| Guarambaré           | 11                  | 1,00%               |
| Villeta              | 10                  | 0,90%               |
| Itá                  | 6                   | 0,60%               |
| Nueva Italia         | 1                   | 0,10%               |
| Total                | 1068                | 100%                |

**9.5 Anexo 5: Listado de clasificación de pacientes con dengue, resultados de LBP y CMA-1, edad, sexo, comorbilidades y signos de alarma.**

| GRUPO | CMA-1<br>ng/mL | LBP<br>ng/mL | Día de<br>síntomas | Edad<br>años | Sexo | Comorbilidad                        | Signo/s de alarma                   |
|-------|----------------|--------------|--------------------|--------------|------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| DG    | 33,3           | 23509,5      | 5                  | 59           | M    | HTA, DM, ERC.                       | Alteración del nivel de conciencia. |
| DG    | 75,3           | 23591,3      | 7                  | 53           | M    | Ninguna.                            | Derrame de líquidos/Shock.          |
| DSSA  | 0,8            | 18360,0      | 3                  | 29           | F    | LES                                 | Ninguna.                            |
| DCSA  | <0,3           | -            | 5                  | 19           | F    | Ninguna.                            | Sang.                               |
| DCSA  | <0,3           | -            | 6                  | 52           | F    | Ninguna.                            | DPR, DA, sang.                      |
| DG    | 52,3           | 23700,3      | 6                  | 68           | M    | HTA, colecistopatía.                | Hpg.                                |
| DSSA  | <0,3           | -            | 7                  | 22           | M    | Ninguna.                            | Ninguna.                            |
| DG    | 38,9           | 22310,6      | 6                  | 82           | M    | HTA, hernia inguinal.               | DPR, DA.                            |
| DCSA  | <0,3           | -            | 2                  | 14           | M    | Ninguna.                            | DPR.                                |
| DCSA  | <0,3           | 9858,3       | 4                  | 22           | F    | Ninguna.                            | Sang.                               |
| DCSA  | 3,11           | -            | 3                  | 51           | M    | SD                                  | DA.                                 |
| DG    | 26,1           | 19586,0      | 5                  | 75           | M    | HTA, DM.                            | Derrame de líquidos/Shock           |
| DG    | 24,4           | 16425,1      | 5                  | 29           | M    | LES, osteoporosis severa, eccema.   | Sang grave.                         |
| DCSA  | 0,24           | 22120,0      | 3                  | 21           | M    | Ninguna.                            | Sang.                               |
| DCSA  | <0,3           | 5390,0       | 6                  | 69           | M    | HTA, DM.                            | Sang.                               |
| DG    | 20,3           | 22228,9      | 7                  | 63           | M    | Ninguna.                            | DPR, sang.                          |
| DG    | 76,5           | 18087,2      | 4                  | 67           | F    | HTA, DM.                            | DA, DPR.                            |
| DG    | <0,3           | 16697,5      | 5                  | 65           | F    | HTA, obesidad.                      | Disnea.                             |
| DCSA  | <0,3           | -            | 6                  | 37           | F    | Ninguna.                            | Ninguna.                            |
| DSSA  | 0,55           | 3427,8       | 3                  | 25           | F    | Ninguna.                            | Ninguna.                            |
| DG    | 66             | 30866,5      | 8                  | 91           | M    | SD                                  | Shock por dengue.                   |
| DSSA  | <0,3           | 7787,0       | 4                  | 31           | F    | Ninguna.                            | Ninguna.                            |
| DCSA  | 3,7            | 19777,0      | 3                  | 78           | M    | Ninguna.                            | Confusión mental.                   |
| DCSA  | 10,3           | -            | 5                  | 49           | F    | Ninguna.                            | DA.                                 |
| DG    | 4,01           | 5689,0       | 4                  | 73           | F    | DM, ERC, artrosis, sínd. demencial. | Somnolencia.                        |
| DCSA  | <0,3           | 8659,0       | 4                  | 47           | F    | HTA                                 | Sang.                               |
| DG    | 47,7           | 20457,8      | 4                  | 35           | F    | IVU altas.                          | Shock/DPR, Derrame de líquidos.     |
| DCSA  | <0,3           | 23782,0      | 2                  | 33           | F    | Ninguna.                            | DA, sang.                           |
| DSSA  | <0,3           | 12746,6      | 5                  | 62           | F    | HTA, LES                            | Ninguna.                            |
| DG    | <0,3           | 17869,2      | 3                  | 80           | M    | DM.                                 | Miocarditis.                        |
| DSSA  | <0,3           | 6316,1       | 6                  | 72           | M    | HTA, DM.                            | Ninguna.                            |
| DCSA  | <0,3           | 8795,6       | 5                  | 38           | F    | Ninguna.                            | DA, sang.                           |
| DCSA  | <0,3           | 10894,0      | 7                  | 16           | F    | Ninguna.                            | Derrame de líquidos, Hpg, DA.       |

|      |      |         |   |    |   |                               |                                                     |
|------|------|---------|---|----|---|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| DG   | <0,3 | 16915,5 | 6 | 14 | M | SD                            | Derrame de líquidos,<br>DA, letargia, sang,<br>Hpg. |
| DSSA | <0,3 | -       | 6 | 46 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DCSA | <0,3 | -       | 2 | 7  | M | Ninguna.                      | DA, sang.                                           |
| DCSA | <0,3 | 8577,7  | 1 | 27 | F | Ninguna.                      | DA, sang.                                           |
| DSSA | <0,3 | -       | 3 | 31 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 12773,8 | 5 | 61 | F | HTA                           | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 7978,0  | 5 | 34 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | 0,4  | 17188,0 | 6 | 15 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 6997,3  | 2 | 78 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 16670,0 | 3 | 29 | M | HTA, LES, nefritis<br>lúpica. | Ninguna.                                            |
| DCSA | <0,3 | 12529,0 | 2 | 21 | F | Ninguna.                      | DA, sang.                                           |
| DSSA | <0,3 | 5553,1  | 4 | 37 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 18305,2 | 2 | 12 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 15880,0 | 3 | 20 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 8659,0  | 7 | 62 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 8332,4  | 3 | 50 | F | HTA, DM.                      | Ninguna.                                            |
| DCSA | <0,3 | 16670,3 | 2 | 49 | F | Artritis reumatoide.          | DPR.                                                |
| DCSA | <0,3 | 7515,0  | 4 | 28 | F | Asma                          | Sang.                                               |
| DSSA | <0,3 | 10376,0 | 4 | 45 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 15880,0 | 2 | 18 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DCSA | 4,4  | -       | 6 | 26 | F | Ninguna.                      | Derrame de líquidos,<br>Hpg.                        |
| DCSA | <0,3 | 15471,0 | 2 | 28 | M | Ninguna.                      | DPR.                                                |
| DG   | 1,3  | 10321,5 | 4 | 72 | M | HTA, DM, EC.                  | DA, DPR.                                            |
| DSSA | <0,3 | 9994,6  | 2 | 25 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | -       | 8 | 21 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DG   | 11,5 | 13373,3 | 2 | 68 | M | HTA, EC.                      | DPR.                                                |
| DCSA | <0,3 | 6615,8  | 4 | 33 | F | Hipotiroidismo.               | Derrame de líquidos.                                |
| DSSA | <0,3 | 13510,0 | 3 | 25 | M | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | 0,35 | 5089,9  | 3 | 45 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 14817,0 | 4 | 50 | F | HTA.                          | Ninguna.                                            |
| DCSA | <0,3 | -       | 7 | 39 | F | Ninguna.                      | Derrame de líquidos,<br>DA, sang, Hpg.              |
| DCSA | <0,3 | 9667,6  | 4 | 32 | M | Ninguna.                      | DA, sang.                                           |
| DSSA | <0,3 | 13455,0 | 4 | 14 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 2719,0  | 4 | 48 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DCSA | <0,3 | 11875,0 | 3 | 23 | F | Ninguna.                      | DA.                                                 |
| DCSA | <0,3 | 16834,0 | 2 | 23 | M | Ninguna.                      | DA, sang.                                           |
| DSSA | 0,35 | 8305,2  | 3 | 28 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 12119,9 | 2 | 22 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |
| DSSA | <0,3 | 17787,0 | 2 | 26 | F | Ninguna.                      | Ninguna.                                            |

|      |      |         |   |    |   |                          |                      |
|------|------|---------|---|----|---|--------------------------|----------------------|
| DCSA | <0,3 | 12583,0 | 3 | 11 | F | Ninguna.                 | DA.                  |
| DSSA | <0,3 | -       | 3 | 39 | F | HTA.                     | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | 13046,0 | 2 | 74 | F | HTA, DM.                 | DA.                  |
| DCSA | <0,3 | 16480,0 | 3 | 25 | F | Ninguna.                 | DPR.                 |
| DCSA | 2,9  | -       | 1 | 18 | F | Ninguna.                 | DA, sang.            |
| DSSA | <0,3 | 16507,0 | 6 | 35 | M | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DSSA | <0,3 | -       | 5 | 24 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DSSA | <0,3 | 9395,0  | 3 | 61 | F | HTA.                     | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | 12828,0 | 4 | 66 | F | HTA.                     | DA.                  |
| DSSA | <0,3 | 12882,8 | 4 | 41 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | 6316,1  | 6 | 45 | M | Ninguna.                 | sang.                |
| DCSA | <0,3 | 15362,4 | 2 | 17 | M | Ninguna.                 | DA, DPR.             |
| DCSA | 0,89 | 7542,0  | 2 | 12 | M | Polipomatosis familiar.  | sang.                |
| DSSA | <0,3 | 6806,5  | 3 | 12 | M | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 5 | 23 | F | Ninguna.                 | DA, sang.            |
| DCSA | 0,3  | 24572,0 | 3 | 48 | F | Ninguna.                 | DA, DPR.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 7 | 59 | F | Ninguna.                 | Sang.                |
| DSSA | <0,3 | 12256,0 | 1 | 24 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 4 | 40 | F | HTA, trasplantada renal. | Derrame de líquidos. |
| DCSA | <0,3 | -       | 8 | 19 | M | Ninguna.                 | DA, sang.            |
| DCSA | <0,3 | 23128,1 | 3 | 26 | F | Ninguna.                 | DPR.                 |
| DSSA | <0,3 | 17025,0 | 5 | 24 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 7 | 51 | F | HTA, DM, EC.             | DPR.                 |
| DCSA | <0,3 | -       | 7 | 21 | F | Ninguna.                 | DPR, sang.           |
| DCSA | 0,86 | 13932,6 | 4 | 79 | M | Ninguna.                 | Sang.                |
| DCSA | <0,3 | -       | 1 | 35 | M | Ninguna.                 | DA, sang.            |
| DSSA | <0,3 | -       | 2 | 14 | M | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DSSA | 1,14 | 10594,0 | 3 | 46 | F | Epilepsia.               | Ninguna.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 4 | 34 | M | PTI.                     | DA, sang.            |
| DSSA | <0,3 | 9640,3  | 3 | 15 | M | Epilepsia, neumonía.     | Ninguna.             |
| DSSA | <0,3 | 6506,8  | 4 | 20 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DSSA | <0,3 | 10485,0 | 3 | 69 | F | HTA, DM.                 | Ninguna.             |
| DSSA | <0,3 | -       | 2 | 34 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | 1,8  | 14872,0 | 5 | 6  | F | Ninguna.                 | DA, DPR.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 2 | 42 | F | HTA.                     | DA.                  |
| DCSA | <0,3 | 18033,0 | 2 | 11 | M | Ninguna.                 | DA.                  |
| DCSA | <0,3 | -       | 3 | 49 | F | Ninguna.                 | DA.                  |
| DCSA | <0,3 | 5117,2  | 5 | 17 | F | Ninguna.                 | DPR.                 |
| DSSA | <0,3 | 14654,0 | 1 | 21 | F | Ninguna.                 | Ninguna.             |
| DCSA | 21,3 | 14736,0 | 5 | 33 | F | Ninguna.                 | DA.                  |
| DG   | 72,4 | 17242,5 | 6 | 70 | F | HTA, DM, artrosis.       | DPR convulsiones.    |

|      |      |         |   |    |   |               |                                      |
|------|------|---------|---|----|---|---------------|--------------------------------------|
| DCSA | <0,3 | 13019,0 | 8 | 14 | M | Ninguna.      | Derrame de líquidos, DA, sang.       |
| DCSA | <0,3 | 6343,0  | 8 | 5  | M | Ninguna.      | DPR, DA, sang.                       |
| DSSA | <0,3 | -       | 8 | 19 | M | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DCSA | <0,3 | -       | 2 | 56 | F | HTA.          | DPR.                                 |
| DCSA | <0,3 | 11302,5 | 2 | 23 | F | Ninguna.      | Derrame de líquidos, DA.             |
| DCSA | <0,3 | -       | 7 | 19 | M | Ninguna.      | Derrame de líquidos, sang.           |
| DSSA | <0,3 | -       | 6 | 47 | F | HTA, LES.     | Ninguna.                             |
| DSSA | <0,3 | -       | 3 | 22 | F | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DSSA | <0,3 | 9967,3  | 2 | 22 | F | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DSSA | <0,3 | 8414,2  | 2 | 45 | F | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DSSA | <0,3 | 17379,0 | 1 | 21 | F | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DCSA | <0,3 | 7760,0  | 4 | 65 | M | HTA, DM, IVU. | DPR.                                 |
| DCSA | <0,3 | -       | 2 | 20 | F | Ninguna.      | DPR.                                 |
| DG   | 9,9  | 15743,9 | 1 | 57 | M | SD            | Acumulación de líquidos, DPR.        |
| DG   | <0,3 | 11820,0 | 2 | 38 | M | SD            | DA, sang.                            |
| DCSA | <0,3 | 10348,8 | 6 | 56 | F | HTA, asma.    | DA.                                  |
| DG   | 52,1 | 18686,6 | 4 | 55 | M | Ninguna.      | DPR.                                 |
| DSSA | <0,3 | 10049,0 | 4 | 22 | F | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DG   | 75,3 | 27517,5 | 5 | 44 | M | ERC.          | DPR Shock/Derrame de líquidos grave. |
| DCSA | <0,3 | 21820,0 | 2 | 30 | F | Ninguna.      | DPR, sang.                           |
| DG   | <0,3 | 19313,4 | 7 | 78 | M | HTA.          | Disnea.                              |
| DCSA | <0,3 | 16316,0 | 7 | 37 | M | Ninguna.      | Sang.                                |
| DCSA | <0,3 | 5907,4  | 5 | 31 | F | Ninguna.      | DA, sang.                            |
| DCSA | 0,24 | -       | 7 | 40 | F | Ninguna.      | Sang.                                |
| DG   | <0,3 | 19667,6 | 5 | 75 | F | HTA.          | Alteración de la conciencia.         |
| DSSA | <0,3 | 17025,0 | 3 | 67 | F | HTA.          | Ninguna.                             |
| DCSA | <0,3 | 7787,0  | 5 | 0  | M | Ninguna.      | DPR.                                 |
| DCSA | <0,3 | 9667,6  | 2 | 21 | F | Ninguna.      | Sang.                                |
| DSSA | <0,3 | 6997,3  | 7 | 15 | M | Ninguna.      | Ninguna.                             |
| DSSA | 60,7 | 1493,2  | 3 | 32 | F | LES.          | Ninguna.                             |
| DCSA | <0,3 | -       | 5 | 48 | M | Ninguna.      | DPR.                                 |
| DCSA | <0,3 | -       | 3 | 69 | F | HTA, cáncer.  | DPR.                                 |

DSSA=dengue sin signos de alarma, DCSA: dengue con signos de alarma, DG=dengue grave, LES= lupus eritematoso sistémico, DM= *Diabetes mellitus*, HTA= hipertensión arterial, ERC= enfermedad renal crónica, EC= enfermedad cardíaca, PTI= Púrpura trombocitopénica idiopática, IVU= infección de las vías urinarias, sang= sangrado, DA= dolor abdominal, DPR= dificultad para respirar, Hpg= hepatomegalia.