

Perfil clínico, hematológico y serológico en pacientes con sospecha de dengue del IICS-UNA, 2009-2013

Alejandra Rojas^I, Laura Aria^I, Yvalena de Guillén^I, Ma. Eugenia Acosta^I, Belén Infanzón^I, Valentina Díaz^{II}, Liz López^I, Teresa Meza^I, Oscar Riveros^I

I Departamento de Producción. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA). Paraguay

II Departamento de Bioquímica Clínica. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA). Paraguay

Rojas A, Aria L, Guillén, Y, Acosta ME, Infanzón B, López L, Meza T, et al. Perfil clínico, hematológico y serológico en pacientes con sospecha de dengue del IICS-UNA, 2009-2013. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2016;14(2):68-74

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

RESUMEN

El dengue constituye una de las enfermedades transmitidas por mosquitos más importante a nivel mundial. La enfermedad puede cursar con un cuadro asintomático, presentarse con un amplio rango de manifestaciones clínicas inespecíficas o cierto porcentaje puede derivar en casos graves. Este estudio observacional descriptivo de corte transversal tuvo como objetivo determinar las características clínicas, parámetros hematológicos y presencia de IgM en 92 pacientes que acudieron al IICS-UNA con sospecha clínica de dengue en el periodo 2009 al 2013. Se utilizó el MAC-ELISA desarrollado en el IICS-UNA, se registraron los datos clínicos-epidemiológicos a través de una encuesta y se determinaron los parámetros hematológicos. Se obtuvieron resultados positivos para IgM en 51/92 (55%) pacientes y resultados negativos en 41/92 (45%). Las características clínicas más frecuentes fueron: fiebre, cefalea, mialgias y artralgias. Entre los pacientes con IgM positiva, 14/51 (27%) manifestaron dolores abdominales, 19/51 (37%) reportaron letargo o postración y 20/51 (39%) declararon tener náuseas y/o vómitos, 4/51 (8%) presentaron leucopenia, 10/51 (20%) valores de hematocrito disminuido y 6/51 (12%) plaquetopenia. Sólo 13/92 (14%) pacientes declararon haber cursado con la enfermedad anteriormente. Del total de pacientes, 4/92 (4%) manifestaron haber presentado algún tipo de hemorragia. Los resultados obtenidos en el estudio refuerzan la importancia de integrar todos los parámetros posibles: detección de IgM, perfil hematológico y la clínica del paciente con sospecha de dengue para brindar un mejor diagnóstico. Así también, es necesario resaltar en cuanto a los signos de alarma para una intervención rápida a fin de evitar complicaciones.

Palabras claves: Dengue, síntomas, IgM, perfil hematológico.

Clinical, hematological and serological profile in suspected dengue patients at IICS-UNA, 2009-2013

ABSTRACT

Dengue is one of the most important mosquito-borne diseases worldwide. The disease may present as asymptomatic, with a wide range of non-specific clinical manifestations or a certain percentage can result in severe cases. This observational, descriptive, cross-sectional study aimed to determine the clinical features, hematological parameters and the presence of IgM in 92 patients who attended to IICS-UNA with clinical suspicion of dengue from 2009 to 2013. The MAC-ELISA developed at IICS-UNA was used, clinical and

Fecha de recepción: junio 2016. Fecha de aceptación: agosto 2016

Autor correspondiente: **Alejandra Rojas** Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, UNA, Paraguay

E-mail: alerojaspy@gmail.com

epidemiological data were recorded through a survey and hematological parameters were determined. Positive results for IgM in 51/92 (55%) patients were obtained and negative results in 41/92 (45%). The most frequent clinical features were fever, headache, muscle and joint pains. Among patients with positive IgM, 14/51 (27%) reported abdominal pain, 19/51 (37%) reported lethargy or prostration and 20/51 (39%) reported having nausea and/or vomiting, 4/51 (8%) had leucopenia, 10/51 (20%) decreased hematocrit values and 6/51 (12%) presented thrombocytopenia. Only 13/92 (14%) patients reported a previous DENV infection. Of the total, 4/92 (4%) presented some type of bleeding. The results of the study reinforce the importance of integrating all possible parameters: IgM detection, hematological and clinical profile of patients with suspected dengue to provide better diagnosis. It is also necessary to emphasize warning signs for a quick intervention to avoid complications.

Keywords: Dengue, symptoms, IgM, hematological profile.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad febril aguda considerada como la principal enfermedad viral transmitida por artrópodos en el mundo, estimándose 390 millones de casos por año (1). Es causada por el virus del dengue (DENV), el cual se divide en 4 tipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (2).

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, esta familia es muy diversa e incluye a virus que infectan tanto a artrópodos como vertebrados. Miembros de esta familia pueden infectar humanos y causar morbilidad severa y mortalidad, por lo que las epidemias atribuidas a flavivirus continúan siendo un gran problema a nivel de salud pública alrededor del mundo (3).

Las manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes infectados por cualquiera de los cuatro tipos del virus del dengue, comprenden desde fiebre aguda indiferenciada hasta condiciones más severas como fiebre hemorrágica y síndrome de shock, que pueden ocasionar la muerte (4). La fiebre hemorrágica se refiere a una vasculopatía caracterizada por extravasación a nivel capilar y desregulación hematológica, que en casos severos puede resultar en un shock hipovolémico que pone en riesgo la vida del paciente (5).

Los síntomas de la enfermedad no son suficientemente específicos para diferenciar el dengue de otras enfermedades febriles agudas, especialmente en áreas endémicas para múltiples enfermedades tropicales como chikungunya, malaria, fiebre amarilla, encefalitis por el virus del Oeste del Nilo o por el virus de San Luis. Por ello, la identificación de casos ha tomado gran importancia en cuanto al diagnóstico diferencial en infecciones causadas por flavivirus durante la fase temprana sintomática (6).

Las infecciones humanas por flavivirus provocan respuestas inmunitarias humorales que resultan en la producción de anticuerpos anti-virus especie específicos así como anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con otros flavivirus (7,8). Esto dificulta el serodiagnóstico de las infecciones secundarias por flavivirus en áreas donde co-circulan múltiples flavivirus, debido a la incapacidad para diferenciar los anticuerpos que causan reacción cruzada (9).

En cuanto al diagnóstico del dengue, los casos se confirman mediante la identificación del virus o por un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos en muestras pareadas en fase aguda y convaleciente. Diversos métodos han sido desarrollados para el diagnóstico laboratorial del dengue, incluyendo: aislamiento del virus mediante cultivo celular, detección viral por inmunofluorescencia, detección de antígenos virales mediante pruebas de ELISA, detección de anticuerpos anti-dengue a través de métodos de inhibición de la hemaglutinación, prueba de fijación de complemento, neutralización o ELISA y la detección de ácidos nucleicos virales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa previa retrotranscripción (RT-PCR) o esta reacción en formato de tiempo real (10).

El diagnóstico del dengue a nivel global se basa principalmente en la detección de anticuerpos del tipo IgM anti-DENV y del antígeno viral NS1. A pesar de que la detección de anticuerpos IgM por ELISA tiene ciertas limitaciones como las reacciones cruzadas, este método es muy sólido y sigue siendo ampliamente utilizado. Además, no precisa equipamientos de alta complejidad por lo que puede ser llevado a cabo en la mayoría de los laboratorios (11). De todas maneras, es ideal aplicar una combinación de métodos para la confirmación de un caso, estableciéndose que para realizar favorablemente un diagnóstico de dengue se deben realizar varias pruebas o detectar varios parámetros (12).

Se considera que nuestro país es endémico para esta enfermedad, registrándose epidemias causadas frecuentemente por más de un tipo de DENV de manera simultánea. Según los reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) hasta la semana epidemiológica N°21 del 2016 se notificaron 115.255 casos probables de dengue en Paraguay, de los cuales 2.491 se confirmaron por laboratorio, detectándose la circulación de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 y se reportaron 16 muertes (13).

El diagnóstico oportuno y preciso del dengue es muy importante en primer lugar porque es necesario para el correcto manejo del paciente al dirigir la atención clínica hacia la aparición de señales de alerta que indiquen un cuadro grave o la complicación de un caso que amenaza la vida del paciente. Así también, la detección de casos índices contribuye a la intensificación del control vectorial a fin de reducir la transmisión de la enfermedad. Por último, un diagnóstico correcto aporta con la provisión de datos sobre la epidemiología de la enfermedad y la carga que ésta representa (5).

Debido a la importancia del dengue como un gran problema de salud pública y a la necesidad de contar con diferentes parámetros que apoyen al diagnóstico de la enfermedad, se desarrolló este estudio con el objetivo de determinar las características clínicas, hematológicas y serológicas en pacientes con sospecha de dengue que acudieron al IICS-UNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio observacional descriptivo de corte transversal con muestreo de casos consecutivos, se incluyeron 92 pacientes que acudieron al IICS-UNA con sospecha clínica de dengue en el periodo 2009 al 2013, con 5 días o más de iniciados los síntomas. Los pacientes fueron derivados al laboratorio del IICS-UNA por profesionales médicos indicando la realización de la prueba de IgM anti-virus del dengue. Se tomó una muestra de sangre de la que se obtuvo el suero, que luego fue utilizado para las pruebas laboratoriales.

Ficha clínica epidemiológica

Los pacientes fueron entrevistados y sus datos clínicos-epidemiológicos fueron registrados en la encuesta provista por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Los datos recolectados fueron: edad, sexo, procedencia, además, si presentaban o no algún signo o síntoma y el tiempo de duración de los mismos: fiebre, cefalea, dolor retro-ocular, mialgia, artralgia, postración, exantema, petequias, dolor abdominal, hemorragias diversas, sudoración, si fueron hospitalizados, si padecieron de dengue anteriormente y si contaban con la vacuna contra la fiebre amarilla.

Prueba ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA)

Las muestras de suero de los pacientes fueron analizadas mediante el MAC-ELISA (de las siglas en inglés, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para captura de anticuerpos IgM) desarrollado en el IICS-UNA. Las placas de poliestireno (*Thermo Fisher Scientific, EEUU*) fueron sensibilizadas con anticuerpos de cabra anti-IgM humana (*Sigma-Aldrich, EEUU*) diluidos en tampón fosfato pH 9,5, mediante incubación a 4°C durante toda la noche. Posteriormente fueron sometidas a un proceso de saturación (tampón carbonato pH 9,5 4% de leche descremada) y post-saturación (tampón fosfato pH 7,4 0,1% de leche descremada). Las muestras de pacientes diluidas (1:50 en tampón fosfato pH 7,4) fueron incubadas en las placas sensibilizadas por una hora a 37°C en cámara húmeda. Sueros controles de IgM positivos y negativos para dengue fueron incubados en las mismas condiciones que las muestras. Luego de cinco lavados con PBS-Tween 20, se añadió el antígeno de dengue (*pool* de los cuatro tipos de DENV, Instituto Pedro Kourí, Cuba) y se incubó por 18 horas a 4°C en cámara húmeda. Fueron realizados cinco lavados con tampón PBS-Tween 20 y fue agregado el anticuerpo anti-DENV conjugado con peroxidasa (producido en el Dpto. de Producción del IICS), se incubó una hora a 37°C en cámara húmeda y se lavó nuevamente siete veces con tampón PBS-Tween 20. Para el revelado de la reacción se adicionó el sustrato: ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) diammonium salt. *Sigma-Aldrich, EEUU*) se incubó a 37°C por 15 minutos en cámara húmeda. La lectura a 405nm de las densidades ópticas se realizó mediante un lector de ELISA (*BioRad 550, Japón*).

Parámetros hematológicos

Mediante el analizador automático para hematología (*Mindray BC-3600, China*) se determinaron los siguientes parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media. La fórmula leucocitaria fue analizada mediante microscopía por un profesional calificado y la velocidad de sedimentación globular o eritrosedimentación fue determinada por el método de Wintrobe.

Consideraciones éticas

Se respetó la confidencialidad de los pacientes por medio de la codificación de las muestras. Se solicitó el consentimiento de los pacientes para ser incluidos en el estudio y que sus muestras de suero formen parte de la seroteca del Departamento de Producción.

Análisis estadísticos

Los datos recolectados en la encuesta, los resultados de los parámetros hematológicos y de la prueba de detección de IgM anti-dengue fueron registrados en una planilla del programa Microsoft® Excel® versión 14. Luego los datos fueron analizados mediante el programa Epi Info™ versión 7.

RESULTADOS

Del total de 92 pacientes incluidos en el estudio, 52 (57%) correspondieron a personas del sexo femenino. La media de la edad fue de 39 años con un rango de 10 meses a 83 años.

En cuanto a los días de evolución de la enfermedad de los pacientes, se observó un rango de 5 a 19 días entre el inicio de los síntomas y la toma de muestra, con un promedio de 8 días.

Se obtuvieron resultados positivos para IgM anti-dengue en 51/92 (55%) pacientes y resultados negativos en 41/92 (45%) pacientes.

Entre los pacientes con resultados positivos para IgM, 20/51 (39%) se encontraban pacientes con 8 a 10 días de evolución de la enfermedad, 16/51 (31%) con 5 a 7 días de evolución y 14/51 (27%) con 11 o más días de iniciados los síntomas de la enfermedad.

Las características clínicas presentadas por los pacientes se describen en la tabla 1. Las manifestaciones clínicas más frecuentes observadas en pacientes con serología positiva fueron: fiebre (86%), cefalea (80%), mialgia (67%) y artralgia (55%). Ningún signo o síntoma se repitió en la totalidad de los pacientes con serología positiva para dengue.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes según resultados de la detección de IgM mediante el método de ELISA de captura.

Características clínicas	IgM anti-DENV (MAC ELISA)	
	Positivo N=51 (%)	Negativo N=41 (%)
Fiebre	44 (86)	36 (88)
Cefalea	41 (80)	29 (71)
Mialgias	34 (67)	22 (54)
Artralgias	28 (55)	19 (46)
Dolor retro-ocular	27 (53)	14 (34)
Náuseas/Vómitos	25 (49)	13 (32)
Petequias	24 (47)	12 (29)
Postración	22 (43)	9 (22)
Dolor abdominal	18 (35)	5 (12)
Sudoración	10 (20)	9 (22)
Exantema	5 (10)	3 (7)
Hospitalización	5 (10)	2 (5)
Hemorragias	2 (4)	2 (5)

Del total de pacientes, 4/92 (4%) manifestaron haber presentado algún tipo de hemorragia, se obtuvieron resultados positivos para IgM anti dengue para dos de estos pacientes. Entre los pacientes con serología positiva, 18/51 (35%) manifestaron dolores abdominales, 22/51 (43%) reportaron letargo o postración y 22/51 (49%) declararon tener náuseas y/o vómitos. Cabe destacar que ninguno de estos pacientes había sido hospitalizado hasta el momento de la toma de muestra para el presente estudio.

Entre los pacientes con resultados positivos de IgM, 5/51(10%) requirieron hospitalización. Estos pacientes manifestaron artralgias, náuseas y/o vómitos. Cuatro de ellos presentaron dolor abdominal, fiebre y mialgias. Ninguno manifestó haber cursado con la enfermedad anteriormente.

En cuanto al perfil hematológico de los pacientes con serología positiva para dengue, 4/51 (8%) presentaron leucopenia y un paciente presentó leucocitosis; se observaron valores de hematocrito disminuidos en 10/51 (20%) casos y en 6/51 (12%) pacientes se registró plaquetopenia. Entre los pacientes con serología negativa para IgM anti-dengue, 5/41 (12%) presentaron valores de hematocrito disminuido y 2/41 (5%) pacientes presentaron leucopenia.

Sólo 13/92 (14%) pacientes declararon haber cursado con la enfermedad anteriormente. Entre los pacientes con resultados negativos para IgM, 5/41(12%) manifestaron haber adquirido la infección en otra oportunidad.

DISCUSIÓN

La presentación clínica de la infección por el virus del dengue es inespecífica, típicamente los cuadros de dengue se caracterizan por fiebre alta, fuerte dolor de cabeza, mialgia, artralgia, dolor retro-orbital y erupción maculopapular. Algunos pacientes presentan petequias, hematomas o trombocitopenia (2). En este estudio se observó una amplia gama de signos y síntomas presentados por los pacientes con sospecha de dengue. No se reportó ninguna manifestación clínica que se repita en todos los pacientes con resultados positivos para IgM.

Además de la fiebre, las manifestaciones clínicas más frecuentes presentadas por los pacientes con IgM positiva para dengue fueron cefalea, mialgia y artralgia, estos resultados concuerdan con los reportados en un estudio descriptivo de la epidemia ocurrida 2011 en Amazonas, Brasil, llevado a cabo por Martins VdCA y colaboradores (col.) en 260 pacientes (14). Un estudio realizado por Anand y col. en 94 pacientes con serología positiva para dengue provenientes de India, señaló otros signos y síntomas más frecuentes como vómitos, dolor de cabeza y exantema (15). Por otro lado Gianella y col. reportaron que los signos y síntomas más frecuentes en una población boliviana con resultados positivos para IgM anti-dengue (N=66) fueron exantema, hemorragias y cefalea (16).

La presencia de signos de alarma tales como vómitos persistentes, dolor abdominal, letargo, inquietud o irritabilidad y oliguria son importantes para una adecuada intervención clínica, a fin de evitar el estado de shock (17). En este estudio se registraron varios casos con signos de alarma sin embargo, no fueron hospitalizados. Se ha descrito en la literatura que las infecciones subsecuentes con diferentes tipos del virus pueden aumentar el riesgo de desarrollar casos graves, con síndromes hemorrágicos o shock (18-21). Debido a las constantes epidemias y a la circulación de varios tipos de DENV en nuestro país, esta situación debe tenerse en cuenta a fin de concientizar a la población para estar atentos ante la aparición de señales de alerta y así acudir a los centros de atención médica para un correcto manejo del caso.

Se tuvo en cuenta como criterio de inclusión que los pacientes debían tener por lo menos con 5 días de iniciados los síntomas de la enfermedad a fin de evitar probables resultados falsos negativos, debido a que se ha descrito que en infecciones primarias la IgM se detecta con frecuencia a partir del quinto día, sin embargo, el momento de la aparición de anticuerpos IgM varía considerablemente entre individuos (17,22). En el presente trabajo se obtuvieron resultados positivos para IgM anti-dengue en 51/92 (55%) pacientes, mostrándose una leve diferencia con un estudio similar en India realizado por Anand y col. en el cual observaron resultados positivos en 45/94 (48%) (15). Si bien son poblaciones distintas, la pequeña diferencia podría deberse a que en el mencionado estudio incluyeron además pacientes con menos de 5 días de iniciados los síntomas, por lo que en estos pacientes los niveles de IgM pudieron haber sido muy bajos y por ello indetectables.

La mayoría de los pacientes con resultados positivos para IgM, 20/51 (39%), se

encontraba con 8 a 10 días de evolución de la enfermedad. En el estudio de Chen y col. observaron que la sensibilidad de la IgM como marcador diagnóstico era baja en los primeros cuatro días de evolución de la enfermedad, pero aumentaba rápidamente de 65,4% (día 5) hasta 88,9% (>7 días) (23).

Los títulos de anticuerpos IgM en infecciones primarias son significativamente mayores que en las secundarias; en las primarias, la IgM puede persistir por más de 90 días, aunque en la mayoría de los pacientes disminuye y ya no se puede detectar alrededor de los 60 días de la infección (17). Por otro lado, en infecciones secundarias los títulos de IgM suelen ser muy bajos, pudiendo incluso ser indetectables (4,11). Esta situación se presenta como una desventaja para el diagnóstico en nuestro país, debido a que la mayoría de la población estuvo expuesta a varias epidemias causadas por el virus, por lo que se esperaría una mayor frecuencia de infecciones secundarias. Si bien sólo el 12% de los pacientes con resultados negativos para IgM manifestó haber cursado con la enfermedad anteriormente, muchas infecciones pueden pasar desapercibidas, esto podría explicar en parte la alta proporción de resultados negativos obtenidos en este estudio. En cuanto a las infecciones inaparentes, estudios poblacionales sugieren que las infecciones asintomáticas son el principal resultado de la exposición al virus del dengue (24). Este hecho refuerza la idea de un enfoque global para el diagnóstico definitivo apoyándose en todas las herramientas posibles.

El seguimiento del paciente a nivel de parámetros hematológicos es fundamental debido a que la hemostasia anormal y la extravasación de plasma constituyen las principales características fisiopatológicas de los casos graves con complicaciones hemorrágicas. Así también la plaquetopenia y el aumento del hematocrito son hallazgos que podrían alertar acerca del estado de shock del paciente (17). En el estudio se observaron valores anormales de los parámetros hematológicos en muy pocos pacientes, esto podría deberse a que la mayoría ya se encontraban fuera de la fase aguda de la enfermedad.

La determinación de los niveles de plaquetas es de suma importancia como posible predictor de hemorragias (25). Gianella y col. destacaron que su hallazgo más llamativo fue la observación de trombocitopenia leve ($p=0,01$) registrada en pacientes con IgM positiva que se encontraban en la fase aguda de la enfermedad, es decir en los primeros 5 días de iniciados los síntomas (16). Si bien en el presente estudio se registró plaquetopenia sólo en el 12% de los pacientes con IgM positiva, varios estudios realizados en pacientes en fase aguda de la enfermedad, describieron niveles disminuidos de plaquetas, como ser el estudio de Butt y col. en el cual registraron plaquetopenia en el 100% (104/104) de la población de estudio, así también Makroo y col. observaron niveles de plaquetas disminuidos en el 85% (191/225) y Rashmi y col. en un 80% (80/100) (25–27).

Se observó que el 8% de los pacientes con serología positiva para dengue presentó leucopenia, una frecuencia más baja que la publicada por Meena y col. que fue del 51% (N=100) en pacientes con IgM positiva (28). La diferencia podría deberse a que en el mencionado trabajo se incluyeron pacientes admitidos a un Hospital de atención terciaria, en cambio el presente estudio abarcó una población de pacientes ambulatorios.

Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la importancia de integrar todos los parámetros posibles, combinando la detección de IgM específica, el perfil hematológico y la clínica del paciente con sospecha de dengue para poder brindar un mejor diagnóstico. Así también se destaca la importancia de concienciar en cuanto a los signos de alarma para la intervención rápida y atención adecuada al paciente a fin de evitar complicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2013 Apr 25;496(7446):504–7.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002/03/15 ed. 2002;2(1):33–42.
3. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. In: D. M. Knipe et al, editor. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1043–125.
4. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*. 2004/01/21 ed. 2004;8(2):69–80.
5. Tricou V, Vu HTT, Quynh NVN, Nguyen CV V, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis*. 2010;10:142.
6. Qiu L-W, Di B, Wen K, Wang X, Liang W, Wang Y, et al. Development of an antigen capture immunoassay based on monoclonal antibodies specific for dengue

- virus serotype 2 nonstructural protein 1 for early and rapid identification of dengue virus serotype 2 infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2008/11/21 ed. 2009;16(1):88–95.
7. Tesh RB, Travassos da Rosa APA, Guzman H, Araujo TP, Xiao S-Y. Immunization with Heterologous Flaviviruses Protective Against Fatal West Nile Encephalitis. *Emerg Infect Dis.* Centers for Disease Control and Prevention; 2002 Mar;8(3):245–51.
 8. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol.* 1989;70(1):37–43.
 9. Crill WD, Chang G-JJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol.* 2004;78(24):13975–86.
 10. Wang SM, Sekaran SD. Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2793–7.
 11. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010/09/09 ed. 2010;4(8).
 12. Rathakrishnan A, Sekaran SD. New development in the diagnosis of dengue infections. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(1):99–112.
 13. PAHO-WHO. Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country - June 17, 2016 (EW 22). 2016.
 14. Martins V do CA, Bastos M de S, Ramasawmy R, Figueiredo RP de, Gimaque JBL, Braga WSM, et al. Clinical and virological descriptive study in the 2011 outbreak of dengue in the amazonas, Brazil. *PLoS One. Public Library of Science;* 2014 Jan;9(6):e100535.
 15. Anand AM, Sistla S, Dhodapkar R, Hamide A, Biswal N, Srinivasan B. Evaluation of NS1 Antigen Detection for Early Diagnosis of Dengue in a Tertiary Hospital in Southern India. *J Clin Diagn Res. JCDR Research & Publications Private Limited;* 2016 Apr;10(4):1–4.
 16. Gianella A, Ávila C, Chávez K, Loayza R. Trombocitopenia asociada a la infección por el virus del dengue. *Rev Enfermedades Infecc y Trop.* 2009;1(1):64.
 17. WHO. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Revised and expanded edition . New Delhi, India: Regional Office for South-East Asia.; 2011.
 18. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam A V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1998/09/30 ed. 1998;352(9132):971–7.
 19. Fischer DB, Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of agspecific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J Biol Med.* 1970/04/01 ed. 1970;42(5):329–49.
 20. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989/05/01 ed. 1989;11 Suppl 4:S830–9.
 21. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008/04/19 ed. 2008;102(6):522–3.
 22. WHO, TDR/WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New. Geneva: TDR/WHO; 2009.
 23. Chen X, Chen R, Gu W, He J, Cai W, Li J, et al. Clinical evaluation of dengue RNA, NS1, and IgM for diagnosis of dengue in Southern China. *J Med Virol.* 2016 Jan;88(1):28–34.
 24. Lakshmi P, Nainar P. Challenges in the early diagnosis of dengue: A practical approach. *J Sci Soc.* 2014 May 1;41(2):85–8.
 25. Makroo RN, Raina V, Kumar P, Kanth RK. Role of platelet transfusion in the management of dengue patients in a tertiary care hospital. *Asian J Transfus Sci. Medknow Publications;* 2007 Jan;1(1):4–7.
 26. Butt N, Abbassi A, Munir SM, Ahmad SM, Sheikh QH. Haematological and biochemical indicators for the early diagnosis of dengue viral infection. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008 May;18(5):282–5.
 27. Rashmi M, Hamsaveena H. Haematological and biochemical markers as predictors of dengue infection. *Malaysian J Pathol.* 2015;37(3):247–51.
 28. Meena K, Jelia S, Meena S, Arif M, Ajmera D, Jatav V. A study of hematological profile in dengue fever at tertiary care center, Kota Rajasthan, India. *Int J Adv Med.* 2016;3(3):621–4.