

IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DENGUE

Alejandra Estévez; María Renée López; Sandra Rosales; Carmen Lucía Contreras; Ingrid Contreras; Erica Dueger & Celia Cordón-Rosales.

Centro de Estudios en Salud, Universidad del Valle de Guatemala

Resumen

Introducción: Los métodos convencionales para evaluar una infección por Virus de Dengue (VD) se basan en la detección de anticuerpos IgM e IgG mediante un ELISA. Sin embargo, una exposición a otro flavivirus es suficiente para que en el suero de un paciente se detecten anticuerpos con reacción cruzada.

Antecedentes y objetivo: El proyecto de Vigilancia de Enfermedades Infecciosas Neurológicas Agudas estudió la incidencia de casos de enfermedades neurológicas causadas por flavivirus, en un esfuerzo coordinado con la Universidad del Valle de Guatemala, el Ministerio de Salud, el Centro para Control y Prevención de Enfermedades y la Universidad Johns Hopkins. En el marco de dicho proyecto, el presente estudio tuvo como meta la implementación de técnicas de ELISA IgG/IgM y RT-PCR tiempo real para discriminar por serotipo, con el fin de analizar si los cuadros febriles de los pacientes con síndrome neurológico estaban relacionados con infecciones de VD.

Resultados: Se trabajaron muestras de suero provenientes de pacientes sospechosos de infecciones arbovirales (n=497), encontrándose 12 casos positivos: 9 casos IgM positivos y 3 casos PCR positivos (serotipos DEN-1 y DEN-2). El análisis de ELISA IgG en muestras pareadas, reveló un 28% (60/ 213) de infección previa, al presentar IgG anti-VD positiva, sin cambio en título en la fase convalescente, con viremia (RT-PCR tiempo real) e IgM negativas.

Conclusiones: Si bien la implementación del RT-PCR tiempo real ha surgido como una fuerte alternativa al aislamiento viral, ofreciendo una ventaja importante que es la posibilidad de diferenciar serotipos del VD, el ELISA constituye una fuerte herramienta aplicable a las instituciones de salud y evaluaciones de rutina.

Palabras clave: Virus de Dengue, RT-PCR, Elisa, método de diagnóstico.

Abstract

Introduction: Traditional methods used to evaluate dengue viral infection rely on the detection of IgM and IgG antibodies by ELISA. However, a previous exposure to a different flavivirus will promote the production of antibodies leading to cross reaction.

Background and objectives: In the hallmark of the Acute Infectious Neurologic Diseases Surveillance project the incidence of neurologic diseases caused by flavivirus was studied, in an effort coordinated by the Universidad del Valle de Guatemala, the Guatemalan Ministry of Health, the Centers for Disease Control and Prevention and John Hopkins University. Thus, the present work aims to complement the latter study by implementing ELISA technique for the detection of IgG and IgM antibodies and a molecular technique such as real time reverse transcriptase PCR (real time RT-PCR) that discriminates dengue serotypes, in order to evaluate whether febrile cases with neurologic syndrome are related with dengue viral infections.

Results: Serum samples collected from patients with suspected arboviral infection (n=497) were analyzed by ELISA and real time RT-PCR. We found 12 positive cases: 9 IgM positive and 3 PCR positive (dengue serotypes 1 and 2). Further IgG testing in paired serum samples revealed previous dengue infection in 28% of the patients (60/213), presenting IgG anti-dengue antibodies, no change in titer in the convalescent phase and IgM and PCR negative results.

Conclusions: Although real time RT-PCR implementation has emerged as a powerful alternative to viral isolation, offering the possibility of identifying dengue serotypes, ELISA is still a good choice for diagnostic testing in health care facilities and routine evaluation.

Key words: Dengue virus, RT-PCR, Elisa, diagnostic testing.

Introducción

Las enfermedades infecciosas neurológicas agudas (EINAs), incluyendo meningitis, encefalitis, meningo-encefalitis y otros síndromes agudos, están asociados a una alta morbilidad y mortalidad (Richman *et al*, 1997; Feigen *et al*, 1998; Roos *et al*, 1999; Whitley *et al*, 2002). Muchos agentes infecciosos han sido relacionados con las EINAs, incluyendo alfavirus como el Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEE), y flavivirus, tales como Virus de Encefalitis

Japonesa, Virus de Encefalitis de San Luis (SLE), Virus del Oeste del Nilo (VON) y Virus de Dengue (VD). Sin embargo, en Guatemala los estudios relacionados con este tema son escasos.

El VD es el agente causal del denominado Dengue clásico (DC) y su forma más grave, el Dengue Hemorrágico (DH). Si bien las manifestaciones neurológicas son inusuales en la infección por VD, varios estudios han reportado casos con

presentaciones neurológicas anormales (Kankirawatana *et al*, 2000; Solomon *et al*, 2000).

Existen cuatro serotipos conocidos del VD (DEN-1, -2, -3, -4). La infección por alguno de estos estimula la inmunidad homotípica que es completa y permanente, siendo la protección cruzada muy incompleta y transitoria. Si bien las características clínicas del dengue varían según la edad del paciente, a grandes rasgos el DC se presenta como

un cuadro febril agudo, de aparición súbita y duración limitada (2 a 7 días), intenso malestar general acompañado de cefalea, dolores musculares, articulares y retro oculares y erupción cutánea. El DH es la forma grave de la enfermedad, produce shock y muerte si no se trata adecuada y oportunamente. Abarca los síntomas del DC con manifestaciones hemorrágicas y aumento de la permeabilidad vascular (WHO, 1997).

Las pruebas serológicas y el aislamiento del virus de muestras clínicas, son los procedimientos utilizados en el laboratorio para diagnosticar una infección sospechosa de VD (Shu y Huang, 2004; WHO 1997). A pesar de que el aislamiento viral es considerado como el método de referencia o estándar de oro, suele ser muy costoso e invierte mucho tiempo y recurso hasta la obtención de un resultado. Esto suele limitar la aplicación del método

para el diagnóstico o fines epidemiológicos y, por ende, actualmente la evaluación de una infección por VD en el laboratorio se realiza mediante ensayos serológicos, basados en la detección de IgM por medio de un ELISA (por sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Sin embargo, cabe resaltar que para la confirmación del diagnóstico se requiere la evaluación de una segunda muestra de suero convaleciente para la comprobación de una seroconversión o de cambios en el título de anticuerpos (WHO, 1997).

Asimismo, se han descrito un número importante de enfoques moleculares para el diagnóstico del VD, basados en la detección de una región específica del ARN viral a través del RT-PCR (por sus siglas en inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*;; Harris et al, 1998, Laue et al, 1999,

Lanciotti et al, 2000, Johnson et al, 2005). La implementación de estas pruebas ha surgido como una fuerte alternativa al aislamiento viral ya que son menos costosas, mas rápidas y muy sensibles y, de acuerdo al protocolo seleccionado, ofrecen ventajas muy importantes como la posibilidad de diferenciar los cuatro serotipos del VD y la detección del ARN viral hasta el décimo día de iniciados los síntomas (De Paula et al, 2004).

En base a estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue aumentar la capacidad para el diagnóstico diferencial del VD, implementando un ELISA y RT-PCR tiempo real con el fin de analizar si los cuadros febriles en los pacientes con síndrome neurológico estaban relacionados con infecciones de VD y de ser así, si estaban vinculadas a algún serotipo particular de VD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general del proyecto

En Guatemala se llevó a cabo un proyecto de Vigilancia de Enfermedades Infecciosas Neurológicas Agudas (EINA) que tuvo como meta estudiar la incidencia de casos de enfermedades neurológicas causadas por flavivirus, incluyendo infecciones por VD y VON. Este proyecto operó (Julio 2005-07), sobre la base de una plataforma de vigilancia en cuatro hospitales situados en distintos departamentos de Guatemala en un esfuerzo coordinado con la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), el Centro para Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, Fort Collins) y la Universidad John Hopkins. En el marco de dicho proyecto, el presente estudio retrospectivo tiene como meta analizar si los cuadros febriles en los pacientes están relacionados con infecciones de VD, evaluando la respuesta inmunológica del paciente (ELISAs IgM e IgG para VD) y si están vinculadas a algún serotipo particular de VD (RT-PCR tiempo real).

Pacientes y obtención de muestras

Se trabajaron las muestras de suero agudo y convaleciente ya colectadas para el estudio de Enfermedades Infecciosas Neurológicas Agudas (EINA) llevado a cabo en los laboratorios del CES-UVG. Los criterios de elegibilidad para los pacientes figuran a continuación. Los pacientes se incorporan al estudio en dos hospitales de referencia del MS de la Ciudad de Guatemala (Hospital San Juan de Dios y Hospital Roosevelt) y en tres hospitales rurales (Escuintla, Zacapa y Santa Rosa). Los hospitales de referencia captan alrededor del 70% de los pacientes, referidos de otros hospitales del interior y de puestos sanitarios, lo que hace que más de la mitad de los casos provengan de áreas fuera de la Ciudad de Guatemala. Los pacientes son elegibles para el estudio siempre y cuando hayan presentado aparición de síntomas/signos de patología del sistema nervioso central (SNC) en los 14 días previos al ingreso (irritación meníngea; encefalopatía; anormalidades multifocales referentes al SNC), fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o historia de fiebre durante el curso de la enfermedad y una indicación de punción lumbar. En todos los casos se registran los datos clínicos y demográficos del paciente, y se obtienen muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) -cuando corresponda- en la visita inicial, al momento de dar el alta y en controles de rutina subsiguientes, 4 a 15 semanas después. La muestra convaleciente se obtuvo en la primera visita de seguimiento 4 semanas después de la visita inicial.

Aspectos Éticos

Para mantener la confidencialidad de la información proporcionada, se asignaron códigos a cada paciente, los cuales no tienen vínculo alguno con su identidad. El análisis de muestras e información que se propone sigue los lineamientos establecidos por la Declaración de Helsinki y sus enmiendas, y no conlleva ningún riesgo para la integridad física y mental de los participantes, como tampoco para el medio ambiente. El proyecto cuenta con la aprobación de los comités de ética de los hospitales participantes, John Hopkins, CDC y Universidad del Valle. Además contó con la aprobación del Ministerio de Salud y Acción Social de Guatemala.

Manejo y procesamiento de muestras

Si bien el proyecto EINA contempló la obtención de muestras de LCR, para fines del presente estudio sólo se trabajaron las muestras de suero agudo y convaleciente (cuando fue posible obtenerlo) a partir de las cuales se prepararon alícuotas que permanecieron a -70°C hasta la realización de los distintos ensayos.

ELISA IgM / IgG

Se evaluaron las muestras de suero para la detección de anticuerpos IgM (muestras agudas $n=497$) e IgG (muestras pareadas de un mismo paciente obtenidas en las fases aguda y convaleciente; $n=213$ pares) mediante un ELISA basado en aquel descrito previamente, con algunas modificaciones menores (Martin y col 2000^{a,b}; Johnson y col, 2000). Los antígenos fueron gentilmente provistos por la Dra Johnson y colaboradores (CDC, Fort Collins).

Brevemente, se sensibilizaron las placas con anticuerpo de cabra anti -IgM ó -IgG humanas (Kirkegaard and Perry Laboratories, USA) a 4°C toda la noche. Se bloqueó con $200\ \mu\text{l}$ de solución salina (PBS pH 7.4, Sigma) + 5% Leche descremada (Dos Pinos) + 0.5% Tween20 (Sigma). Después de 5 lavados con PBS 0.05% Tween20, se agregó $50\ \mu\text{l}$ de las muestras control y desconocidas (en duplicados); los controles negativos y muestras a evaluar se diluyeron a 1:400, los controles positivos para Dengue a 1:1,800, y los positivos para VON a 1:800. Se incubó a 37°C por una hora y luego de lavar se agregó $50\ \mu\text{l}$ de los antígenos (antígenos DEN: DEN 1, 2 y 4 a 1:120 y DEN 3 a 1:80; antígenos VON: 1:320, control negativo -sin antígeno- células COS-1 se utilizó en 1:160). Se incubó a 4°C por toda la noche. Al día siguiente

se lavó 5 veces y se agregó 50 µl de anticuerpo monoclonal 6B6C-1 conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:3,000; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pa.). Luego de una hora a 37°C se lavó 10 veces y se agregó 75 µl de sustrato de peroxidasa TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina, Kirkegaard and Perry Laboratories, USA). Se incubaron las placas en oscuridad por 10 minutos y se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 1N (EM Science) y se leyó a 450nm en un lector de ELISA.

Las muestras se corrieron en pares: con antígeno (DEN 1-4) y sin antígeno (Células COS-1), de manera que cada muestra lleve su respectivo control negativo. Para la interpretación de los resultados, se calculó un valor de P/N-razón entre la densidad óptica (DO) de una muestra con antígeno (P) y la DO de su control negativo (COS-1) (N). Para que una prueba sea válida se deben dar dos condiciones: 1- el P/N de los controles positivos debe ser mayor que 2, de lo contrario la prueba se considera inválida y se debe repetir; y 2- el valor promedio de las DO de las muestras y controles positivos debe ser 3 veces mayor que el promedio de las DO de su par sin antígeno (células COS-1). La interpretación de los valores de P/N de pacientes mayor o igual que 3 debe notificarse como IgM/IgG positivo y los que presenten valores comprendidos entre 2 y 3 se consideran indeterminados. Los negativos serán aquellos cuyos P/N sean menores a 2.

RT-PCR tiempo real

Para la extracción del ARN se trabajó con el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. El ARN se guardó a -70°C hasta la realización de los ensayos.

El protocolo de RT-PCR tiempo real está basado en aquel descrito por Johnson y colaboradores (2005). La prueba utiliza oligonucleótidos cebadores (*primers*) y sondas fluorescentes de hidrólisis TaqMan, específicos para cada serotipo del VD reportado previamente (Johnson *et al*, 2005). Las secuencias pueden apreciarse en la Tabla I. Se realizó una reacción multiplex para detección de serotipos de VD -2, 3 y 4, en la cual se combinaron 50 pmol de cada primer y 9pmol de sonda en una reacción de 25µl. Se utilizó el kit iScript One-Step RT-PCR (Bio-Rad, CA). Se realizó transcripción inversa por 10 minutos a 50°C, seguido de 45 ciclos de amplificación, en un termociclador Applied Biosystems 7500 Real -Time PCR System. Se utilizó una temperatura de "annealing" de 60°C. Para la detección de DEN-1 se realizó una reacción simple con las mismas condiciones antes mencionadas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SAS. Las proporciones se compararon utilizando la prueba Fisher Exact de dos colas. Se calcularon coeficientes de probabilidad (*odds ratio*) para cada técnica con el fin de analizar la probabilidad de encontrar un resultado positivo por uno u otro procedimiento. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar diferencias entre medias. En todos los casos, el nivel de significancia $p < 0.05$ se utilizó para rechazar la hipótesis nula.

Tabla I. Secuencias de cebadores y sondas de hidrólisis TaqMan utilizados en el protocolo de RT-PCR tiempo real (Johnson *et al*, 2005)

Serotipo	Secuencia	Posición genoma	Fluoróforo/Quencher
DEN-1 F	5'-CAAAGGAAGTCGTGCAATA-3'	8973	
DEN-1 C	5'-CTGAGTGAATTCTCTACTGAACC-3'	9084	
DEN-1 probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998	FAM/BQH-1
DEN-2 F	5'-CAGGTTATGGCACTGTCCAGAT-3'	1605	
DEN-2 C	5'-CCATCTGCAGCAACACCATCTC-3'	1583	
DEN-2 probe	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008	FAM/BQH-1
DEN-3 F	5'-GGACTGGACACGCACTCA-3'	740	
DEN-3 C	5'-CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT-3'	813	
DEN-3 probe	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	762	TR/BHQ-2
DEN-4 F	5'-TTGTCCATATGATGCTGGTCG-3'	904	
DEN-4 C	5'-TCCACCTGAGACTCCTTCCA-3'	992	
DEN-4 probe	TTCCTACTCTACGCATCGATTCCG	960	Cy5/BHQ-3

RESULTADOS

El diagnóstico de una infección por VD se basó en las técnicas de RT-PCR tiempo real y ELISA para IgM/IgG. La positividad de alguna de estas pruebas, y no necesariamente ambas, confirmó el diagnóstico de dengue en un paciente.

En total, se obtuvieron 533 muestras de suero agudo de pacientes sospechosos de EINAs que participaron del estudio. Como se descartaron aquellos casos presentando etiología bacteriana, se analizaron un total de 497 muestras por ELISA y RT-PCR tiempo real, encontrándose 12 positivos para VD (12/497; 2.4%). La edad media del grupo de pacientes con infección viral fue de 23.3 años (rango 0.1 a 53 años), con 18.2 % mujeres y 81.8% hombres. El 80% de los casos de VD ocurrió durante la época lluviosa, abarcando Mayo a Octubre inclusive. Las manifestaciones clínicas de dichos pacientes se detallan en la Tabla II.

El 25% (3/12) de las infecciones fueron detectadas por medio del RT-PCR tiempo real, mientras que el restante 75% (9/12) mediante el ensayo serológico. En ningún caso una muestra de suero fue positiva por ELISA y RT-PCR tiempo real simultáneamente (tabla III). Cabe destacar, que si bien no era parte de este estudio, también se analizaron (por ambas técnicas) las muestras de LCR de los 12 pacientes positivos, obteniéndose resultados similares. En los LCR de los 3 casos positivos por RT-PCR tiempo real en suero, también se detectó ARN viral de VD. Además, en las otras 9 muestras de LCR se detectaron anticuerpos IgM, resultados que concuerdan con los sueros de esos mismos pacientes (Erica Dueger, resultados no publicados).

Respecto a la distribución de serotipos de VD detectados por RT-PCR tiempo real, no se registraron infecciones con los serotipos 3 y 4, mientras que se encontraron 2 casos de DEN-1 y 1 caso de DEN-2.

Tabla II.

Manifestaciones clínicas de los 12 pacientes con infección por VD y síndrome neurológico.

Manifestaciones clínicas de los pacientes con VD y síndrome neurológico	
	n (%)
Fiebre	12 (100)
Diarrea	8 (66.6)
Dolor muscular	8 (66.6)
Dificultad para caminar	8 (66.6)
Vómitos	7 (58.3)
Alteración de la conciencia	7 (58.3)
Náusea	6 (50.0)
Dolor de articulaciones	6 (50.0)
Dolor generalizado	6 (50.0)
Cambios en la personalidad	6 (50.0)
Dolor de cabeza	6 (50.0)
Vértigo	6 (50.0)
Dificultad para hablar	5 (41.6)
Dolor de garganta	5 (41.6)
Convulsiones	4 (33.3)

Fuente: *Acute Infectious Neurologic Diseases (AIND) Project* Colaboración Universidad del Valle de Guatemala (UVG-CES), Ministerio de Salud y Acción Social de Guatemala, Centers for Disease Control and Prevention y Universidad John Hopkins.

Tabla III.

Comparación de los resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real y ELISA IgM; las casillas reflejan el número de casos; Pos= positivo; Neg=negativo.

ELISA IgM	RT-PCR tiempo real		Total
	Pos	Neg	
Pos	0	9	9
Neg	3	485	488
Total	3	494	497

Fisher Exact Test; Odds ratio PCR versus ELISA 0.44; $p=0.16$

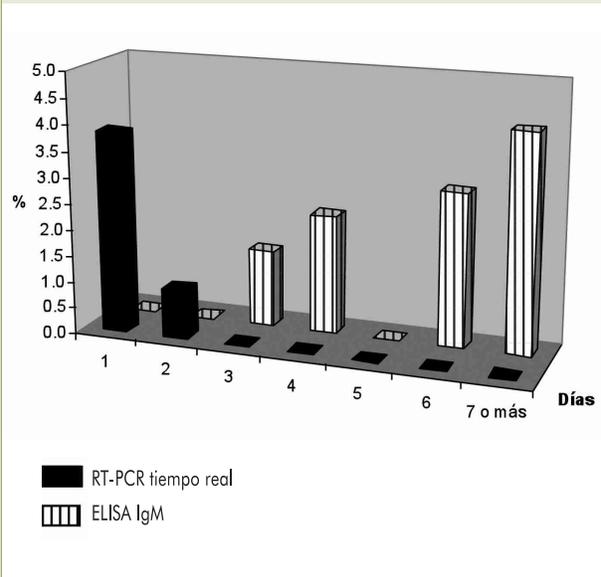
Fuente: Proyecto FODECYT 012-2007

En la gráfica I se presentan los resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real y ELISA, teniendo en cuenta el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la fecha de toma de la muestra. De acuerdo a ello, se observa que todas las muestras positivas por RT-PCR tiempo real fueron tomadas hasta 2 días después del inicio de síntomas (promedio 1.33, rango 1-2) mientras que la ventana de detección del diagnóstico serológico fue más amplia (promedio 10.77, rango 3-18) siendo significativa la diferencia entre medias ($p=0.01$, Mann-Whitney U-Test).

En el estudio, la obtención de muestra convaleciente fue exitosa en un 43% de los casos. Al examinar los anticuerpos IgG anti-VD en muestras pareadas por ELISA, se encontró que un 28% (60/ 213 pares) eran positivas. Sin embargo, ninguno de estos sueros evaluados fue IgM positivo ni presentó viremia activa (PCR negativo) y además, en ningún caso se registró un aumento en el título de anticuerpos IgG en la muestra convaleciente.

Gráfica 1:

Resultados obtenidos por las técnicas de RT-PCR tiempo real y ELISA IgM, en muestras de suero agudo de pacientes febriles con EINA, de acuerdo a los días de inicio los síntomas.



Días Post- Síntomas	1	2	3	4	5	6	7 ó más
No. Muestras	52	106	68	44	47	34	144
RT-PCR tiempo real	(3.80)	(0.90)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
ELISA IgM	(0)	(0)	(1.5)	(2.3)	(0)	(2.9)	(4.2)

Fuente: Proyecto FODECYT 012-2007

DISCUSIÓN

La detección temprana del VD en un paciente es lo que permite establecer una respuesta rápida en las zonas afectadas, respuesta frecuentemente orientada al control del vector. Hoy en día no existe una vacuna o cura para la enfermedad causada por el VD, por lo que el desarrollo de programas de vigilancia, basados en la detección del VD por técnicas de laboratorio adecuadas, emerge como un asunto de prioridad en materia de salud pública, no solamente a nivel clínico sino también a nivel nacional, para lograr proveer señales tempranas de una posible epidemia.

Con el fin de aumentar la capacidad de laboratorio para la detección del VD, en el presente estudio retrospectivo se implementó un abordaje molecular, en combinación con un ensayo serológico, para apoyar el diagnóstico de pacientes febriles con afección neurológica. El estudio reveló un 2.4% de infección con VD, en concordancia con resultados de otros autores, quienes han reconocido manifestaciones anormales del sistema nervioso central asociadas a un cuadro clínico de dengue (Hendarto y Hadinegoro, 1992; Patey *et al*, 1993; Ramos *et al*, 1998).

En los resultados del presente trabajo, se encontró que sólo una cuarta parte del total de casos positivos para VD, fueron RT-PCR tiempo real positivos. Es importante destacar que el tiempo de recolección de las muestras es crucial en la interpretación de los resultados del RT-PCR tiempo real por la duración de la viremia. En la enfermedad causada por el VD, la viremia aumenta típicamente antes del comienzo del cuadro febril, de 4 a 5 días previos a la presencia de síntomas, luego presenta un pico a los 2 ó 3 días de haberse iniciado la fiebre y finalmente disminuye, coincidiendo con la desaparición de los síntomas febriles. Por otro lado, los niveles de IgM son detectables a

partir del tercer día de iniciado el cuadro febril y hasta 2 meses post-infección. En consecuencia, es de esperar que el test serológico sea más efectivo en muestras tardías, siendo el RT-PCR tiempo real aplicable a muestras agudas tempranas, tomadas cuando el paciente aun presenta un cuadro febril y no al acudir al servicio de salud en un estadio más avanzado de la enfermedad. Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente expuesto, ya que las muestras de los 3 casos detectados por medio del RT-PCR tiempo real habían sido recolectadas hasta 2 días posteriores de iniciados los síntomas, al tiempo que la prueba de ELISA IgM evidenció más de la mitad de las infecciones (75%; 9/12) en muestras tomadas a partir de los 3 días de iniciados los síntomas.

La utilidad del RT-PCR tiempo real para la detección de VD en muestras clínicas ya ha sido demostrada en laboratorios de Latinoamérica como Nicaragua, Bolivia y Ecuador (Balmaceda *et al*, 1999, Harris *et al* 1998; Peredo *et al*, 1999), países donde el VD es endémico. La ventaja que ofrece esta técnica por sobre otras como la serología, reside en la identificación del serotipo de VD circulante, información que es de suma importancia considerando que la infección con un serotipo constituye un factor de riesgo para el desarrollo del DH (Leong *et al*, 2007). En nuestro estudio, en los tres casos analizados se identificó serotipo 1 (2/3) y serotipo 2 (1/3), coincidiendo con los reportes del Laboratorio Nacional de Salud, laboratorio de referencia en Guatemala, sobre los serotipos circulantes en los años 2006 y 2007 (WHO).

El presente estudio reveló un 28% de muestras negativas a IgM pero positivas a IgG sin cambios en el título de IgG en la muestra convaleciente. Debido a la persistencia de anticuerpos IgG y su prevalencia en áreas endémicas como la nuestra, una simple muestra de suero demostrando la presencia de estos anticuerpos tiene significado clínico limitado. Así, la detección de IgG como método diagnóstico depende de la toma de muestras pareadas que demuestren un cambio de título de por lo menos cuatro veces, entre la fase aguda y convaleciente, a menos que la muestra única posea un título sugestivo de infección secundaria (Vordam *et al*, 1997). Esto sugiere, que la probabilidad de encontrar pacientes que fueran negativos para IgM pero positivos para IgG son altas y por tanto, las pruebas serológicas con ambos tipos de anticuerpos es de vital importancia en zonas endémicas.

Una diferencia relevante entre las ecologías de Guatemala y otras regiones de Norteamérica como Estados Unidos, es la circulación amplia de otros flavivirus, incluyendo el patógeno humano VD y otros como el Virus del Oeste del Nilo (Morales-Betoulle ME *et al*, 2006). En este escenario, los ensayos serológicos suelen responder a limitaciones relacionadas con la naturaleza antigénica de los flavivirus ya que, además de compartir morfología y estructura genómica, los flavivirus comparten determinantes antigénicos que pueden complicar el diagnóstico de infecciones mediante los ensayos serológicos clásicos. Esto sugiere que el ensayo serológico es insuficiente para elaborar un diagnóstico etiológico concluyente en pacientes previamente expuestos a otros flavivirus o en co-infecciones. Teniendo en cuenta dichos antecedentes, las muestras de los pacientes con diagnóstico sospechoso de VD del presente estudio, fueron evaluadas en CDC Fort Collins por otras técnicas serológicas y por la prueba de neutralización por reducción en placa (PRNT por sus siglas en inglés *Plaque Reduction Neutralization Test*), para descartar reactividad cruzada a otros flavivirus y alfarivirus. Los resultados negativos para SLE, WNV y VEE junto con los resultados positivos para VD, respaldaron el diagnóstico de VD en los 12 casos de nuestra investigación (Erica Dueger, resultados no publicados).

CONCLUSIÓN

Muchos casos de enfermedad febril causada por VD no pueden ser diagnosticados mediante criterios clínicos. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial por laboratorio es de vital importancia, para distinguir un DC y/o DH de otras enfermedades

tropicales, sobretudo en países como Guatemala donde el dengue es endémico. Recurrir a las pruebas serológicas para elaborar un diagnóstico de infección por VD, sigue siendo la opción más acertada, en un contexto donde los escasos recursos financieros y la búsqueda de servicios de salud en estadios avanzados de la enfermedad, suelen limitar la aplicación del RT-PCR tiempo real, aun cuando éste ofrezca notables ventajas como la discriminación por serotipo. La reactividad cruzada entre Flavivirus representa un gran problema para la vigilancia epidemiológica, control y prevención del dengue, por lo que nuevas estrategias de diagnóstico de laboratorio son necesarias para suministrar un diagnóstico específico así como también para describir el posible patrón de dispersión de los serotipos circulantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, SENACYT (línea de financiamiento FODECYT Proyecto 012-2007) por el apoyo financiero para la realización de este proyecto. A la Dra María Eugenia Morales-Betoulle del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala y la Dra Bárbara Johnson de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades CDC Fort Collins por colaborar con nuestro estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Balmaceda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 Dengue Epidemia in Nicaragua (1999) *Am J Trop Hyg* 61(6): 893-897.
- De Paula SO, Lopes da Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis (2004) *Brazilian J Infect Diseases* 8(6): 390-398.
- Feigen RD, Cherry JD. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 4th Edn 1998.
- Harris E, Roberts GT, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaceda A. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR (1998) *J Clin Microbiol*. Sept: 2634-2639.
- Hendarto SK & Hadinegoro SR. Dengue Encephalopathy. *Acta Paediatr Jpn* 1992; 34:350-357.
- Johnson, A.J., Martin, D.A., Karabatsos, N. and Roehrig, J.T.: Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical Microbiology* 38:1827-1831, 2000.
- Johnson BW, Russell BJ and Lanciotti RS. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. (2005) *J Clin Microbiol*. 43(10): 4977-4983.
- Kankirawatana P, Chokephaibulkit K, Puthavathana P, Yoksan S, Apintanapong S, Pongthapisit V. Dengue infection presenting with central nervous system manifestation. *J Child Neurol*. 2000 Aug;15(8):544-7.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey M, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT. Rapid detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan Reverse-transcriptase-PCR Assay (2000) *J Clin Microbiol* 38(11): 4066-4071.



Alejandra Estévez
aestevez@gt.cdc.gov

- Laue T, Emmerich P, Schnitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using TaqMan automated amplification system (1999) *J Clin Microbiol* 37: 2543-2547.
- Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairo P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*. 2007 Nov;24(4):227-36.
- Martin DA, Muth DA, Brown T, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections. *J. Clin. Microbiol.* (2000^a) 38:1823-1826.
- Martin DA, Karabatsos N, Roehrig JT. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. (2000^b) *J. Clin. Microbiol.* 38:1827-1831.
- Morales-Betouille ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R, Cordón-Rosales C. West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):1038-9.
- Patey O, Ollivaud L, Breuil J, Lafaix C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:793-802.
- Ramos C, Sanchez G, Pando RH. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic fever. *J Neurovirol* 1998; 4:465-468.
- Peredo C, Garron T, Pelegrino JL, Harris E, Gianella A. Detection and identification of dengue-2 virus from santa cruz-bolivia by a single tube RT-PCR method. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. (1999) 41(3):207-8.
- Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D, Mota J, Ramos J, Flores A, Llausás E. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol*. 1998 Aug;4(4):465-8.
- Roos KL. Encephalitis. *Neurol Clin* 1999; 17:813-33.
- Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clinical Virology* 1997.
- Shu, P. Y., and J. H. Huang. 2004. Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:642-650.
- Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, Loan HT, Day NP, Farrar J, Myint KS, Warrell MJ, James WS, Nisalak A, White NJ. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000 Mar 25;355(9209):1053-9.
- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Gubler DJ, Kuno G. Eds. Wallingford, UK: CAB International. 1997; p 313-334.
- Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 2002;359:507-13.
- WHO. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2006.htm>
<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2007.htm>
- WHO, 1997 *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd edition, World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>