

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Predicción del serotipo del virus del dengue mediante la respuesta de anticuerpos IgM

Lic. Iselys Delgado,<sup>1</sup> Susana Vázquez,<sup>2</sup> José Ramón Bravo<sup>3</sup> y Dra. María Guadalupe Guzmán<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio en 4 grupos de muestras de suero procedentes de Cuba, Costa Rica, Nicaragua y Panamá, con el objetivo de determinar el serotipo del virus dengue responsable de una epidemia o brote, aplicando el Elisa de Captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA). Se empleó el estuche diagnóstico Dengue-IgM con cada uno de los serotipos por separado y se calculó un valor índice (densidad óptica de la muestra / valor de corte) en cada caso, con los cuales se realizaron 2 análisis estadísticos; el análisis de varianzas de Fisher y el cálculo de la LSD (*Litter significant difference*). Los cálculos permitieron determinar que en Cuba y Panamá circuló el serotipo 2 y en Costa Rica el serotipo 1, esto correspondió con los serotipos aislados durante las respectivas epidemias y en el caso de Nicaragua, las respuestas son muy heterogéneas, no se pudo determinar el serotipo responsable, probablemente porque en este país han circulado más de 2 serotipos a la vez.

DeCS: VIRUS DEL DENGUE/diagnóstico; TESTS DE ELISA, TESTS SEROLOGICOS.

La fiebre del dengue es endémica en la mayoría de los países americanos, donde los serotipos 1, 2 y 4 se encuentran en amplia circulación. En la última década esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública principal en la mayoría de estos países. Después de una ausencia de alrededor de 20 años, aparece el serotipo 3 en América Central hacia finales de 1994, extendiéndose posteriormente al Caribe.<sup>1</sup>

El diagnóstico virológico del dengue es uno de los problemas más serios que enfrentan los sistemas de vigilancia de salud en la región, pues se necesita disponer de las técnicas de aislamiento e identificación viral o de la reacción en cadena de la polimerasa para poder conocer el virus y su serotipo circulante. La primera es un método demorado y engorroso y la segunda aunque es rápida resulta costosa y no todos los laboratorios pueden disponer de ellas.<sup>2</sup>

El diagnóstico serológico del dengue resulta de gran utilidad,<sup>3-7</sup> dentro del cual se aplican los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA). El de captura de anticuerpos IgM anti-dengue conocido como MAC-ELISA<sup>8</sup> es el sistema que ha sido propuesto por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), por su elevada especificidad, sensibilidad y rapidez en su ejecución.<sup>9</sup> Este sistema es por lo tanto una herramienta de gran valor para la vigilancia serológica de la fiebre del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y es la prueba serológica seleccionada por la mayoría de los laboratorios.<sup>3,9</sup> La detección de anticuerpos IgM anti-dengue indica una infección activa o reciente. Estos anticuerpos se desarrollan rápidamente durante la infección y son detectables a partir del quinto día del comienzo de los síntomas. Su duración en sangre es hasta 3 meses aproximadamente.<sup>9</sup>

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias. Licenciada de Bioquímica.

<sup>3</sup> Doctora en Medicina. Especialista de II Grado en Bioestadística.

<sup>4</sup> Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista de II Grado en Microbiología.

En ausencia de un diagnóstico virológico, el MAC-ELISA representa una alternativa interesante para la identificación de los serotipos.<sup>8</sup> Teniendo en cuenta esto y la existencia de los 4 serotipos del virus dengue en las Américas, se presenta un estudio en 4 países afectados: Cuba, Costa Rica, Panamá y Nicaragua, enmarcado dentro de la vigilancia epidemiológica que se lleva a cabo en la región.

## MÉTODOS

### *Universo*

Se estudiaron sueros de pacientes clínicamente sospechosos de dengue, procedentes de 4 países, los cuales resultaron positivos de anticuerpos IgM.

*Grupo 1:* 40 sueros de Cuba obtenidos en el primer semestre de 1997.

*Grupo 2:* 44 sueros de Costa Rica que fueron obtenidos a comienzos de 1994.

*Grupo 3:* 20 sueros de Panamá, de ellos 7 pares de sueros y 6 monosueros, obtenidos a finales de 1993.

*Grupo 4:* 33 sueros de Nicaragua obtenidos en el segundo semestre de 1994.

### *Antígenos*

Se utilizaron antígenos de los 4 serotipos del virus dengue preparados por el método de sacarosa-acetona a partir de cerebro de ratón lactante infectado. Las cepas empleadas fueron las cepas patrones: dengue 1 (Hawai), dengue 2 (Nueva Guinea C), dengue 3 (H-87) y dengue 4 (H-241). Se determinó el título hemaglutinante en cada caso mediante la técnica de hemaglutinación.<sup>10</sup>

### *ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA)*

Se utilizó el estuche diagnóstico dengue IgM<sup>9</sup> para definir los casos positivos, el cual emplea una mezcla de los 4 serotipos. Todos los sueros que resultaron positivos fueron probados frente a cada uno de los 4 serotipos por separado, a una concentración de 16 unidades hemaglutinantes (UH) cada uno. Se calculó el valor de corte (VC)

que corresponde al doble del promedio de los controles negativos y se definieron como positivos aquellos sueros que presentaron un valor de densidad óptica (DO) mayor o igual al valor de corte. Los sueros se trabajaron en la dilución 1/20. En cada uno se determinó el valor índice (VI) que se define como la relación entre la DO de la muestra sobre el VC.

### *Análisis estadístico*

Se realizó el análisis de varianza de Fisher y el cálculo de la LSD (*litter significant difference*).<sup>11</sup>

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos por el MAC-ELISA al enfrentar los sueros con cada uno de los serotipos son mostrados en la tabla 1. Las respuestas fueron muy variadas, encontrándose diferentes combinaciones: sueros que reaccionaron de forma cruzada a los 4 serotipos, otros lo fueron a 3 y otros a 2. Estas respuestas se observaron en todos los países aunque no en todos mostraron las mismas combinaciones. En todos los países excepto Panamá, se observó el mayor porcentaje con el entrecruzamiento de los 4 serotipos.

Algunos sueros mostraron respuesta monotípica, es decir, a un solo serotipo, correspondiendo a dengue 2 en Cuba y Panamá, a dengue 1 en Costa Rica y en Nicaragua a dengue 1, 3 y 4 indistintamente.

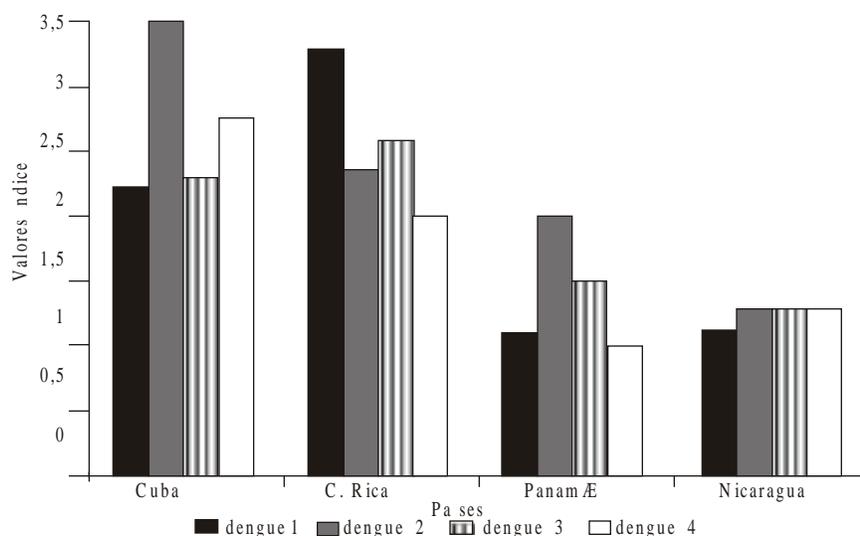
### *Determinación del valor índice y análisis estadístico*

En la figura se presentan las medias de los valores índices para cada grupo de sueros enfrentados a los serotipos. Como se observa, para dengue 1 fue más alto en Costa Rica, para el dengue 2 se observó en Cuba y Panamá, y en Nicaragua se obtuvieron valores muy similares para el dengue 2, 3 y 4.

Para comprobar la significación estadística de estos resultados se les aplicó a las medias de los VI obtenidos para cada serotipo, dentro de los grupos de sueros de cada país, la prueba de Fisher y la LSD (*litter significant difference*). Como se aprecia en la tabla 2, los casos de Cuba,

**TABLA 1.** Resultados obtenidos por el MAC-ELISA al enfrentar los sueros con cada uno de los serotipos del virus dengue

Combinación de serotipos	Cuba (40)		Costa Rica CR (44)		Panamá (20)		Nicaragua (33)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
1, 2, 3, 4	29	72,5	28	63,6	5	25	19	57,5
1, 2, 3	3	7,5	7	15,9	7	35	0	0
1, 2, 4	1	2,5	2	4,5	0	0	0	0
1, 3, 4	2	5,0	1	2,3	0	0	2	6,0
2, 3, 4	1	2,5	0	0	0	0	0	0
1, 2	1	2,5	1	2,3	0	0	1	3,0
1, 3	0	0	1	2,3	0	0	1	3,0
2, 3	1	2,5	1	2,3	3	15	1	3,0
3, 4	0	0	0	0	0	0	4	12,1
1	0	0	3	6,8	0	0	2	6,0
2	2	5,0	0	0	5	25	0	0
3	0	0	0	0	0	0	2	6,0
4	0	0	0	0	0	0	1	3,0

**Fig.** Representación de las medias de los valores índices para cada serotipo dentro de cada país.

Costa Rica y Panamá, mostraron diferencias significativas para una  $p < 0,01$ . En el caso de Nicaragua no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

**TABLA 2.** Resultados del análisis de varianza de Fisher y LSD en cada país

País	F	P	Serotipo	LSD
Cuba	10,621	< 0,00001	2	0,634
Costa Rica	5,08	< 0,01	1	0,594
Panamá	11,616	< 0,001	2	0,36
Nicaragua	1,475	> 0,05	-	-

LSD: *litter significant difference*.

## DISCUSIÓN

En 1977 en Cuba se reportó una epidemia de fiebre del dengue causada por el serotipo 1 durante la cual se observaron más de medio millón de casos. Cuatro años después, en 1981, se produce la primera epidemia de dengue hemorrágico de la región en la cual se notificaron 344 203 casos, 10 312 casos severos y 158 defunciones. Su agente causal fue el serotipo 2. La epidemia fue controlada y una vez eliminada, se estableció un programa de erradicación del vector así como un sistema de vigilancia pasivo de todos los casos sospechosos.<sup>2,12</sup>

En enero de 1997, en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" se establece un sistema de vigilancia activo para dengue en el municipio de Santiago de Cuba, porque existían varios factores de riesgo que podrían favorecer la reemergencia de esta enfermedad. Este sistema de vigilancia activo permitió detectar los primeros casos de dengue el día 28 de enero. En 3 de los primeros 7 casos se detectó por la reacción en cadena de la polimerasa, que el serotipo que circulaba era el 2, lo cual fue confirmado posteriormente por aislamiento e identificación utilizando anticuerpos monoclonales.

Un total de 40 muestras correspondientes a esta epidemia fue estudiado, obteniéndose en 2 de ellas una respuesta monotípica al serotipo 2, ambos casos eran de infecciones primarias. En el estudio realizado con los valores índices para la LSD fue significativa la respuesta para el dengue 2.

Costa Rica erradicó el vector *Aedes aegypti* en 1960, sin embargo desde 1971 se detectaron frecuentes reinfestaciones principalmente en Punta Arena, Liberia y Limón. Mediante actividades de control se limpiaron estas localidades. En 1993 reaparece la enfermedad después de más de 40 años de ausencia, el dengue 1 resultó el agente etiológico de esa epidemia, cuya circulación se mantuvo hasta 1996 en que se reporta el dengue 3 en Costa Rica.<sup>13</sup>

El grupo de Costa Rica estuvo constituido por 44 monosueros obtenidos a comienzos de 1994. En ellos fue significativa la respuesta del valor índice para el dengue 1 (serotipo circulante). Hubo 3 casos que dieron una respuesta monotípica al serotipo 1 y todos eran primarios.

Panamá, a pesar de estar reinfestado desde 1985, resultaba el único país del istmo centroamericano que había detectado transmisión autóctona de virus dengue, sin experimentar una epidemia explosiva. La epidemia de Panamá fue causada por el virus tipo 2 y se aisló de muestras agudas de 3 pacientes febriles con 1 d de evolución de la enfermedad. Solo se detectaron 14 casos autóctonos y 1 importado en 400 pacientes investigados entre octubre y diciembre de 1993.<sup>14</sup>

En este estudio se pudo trabajar un total de 7 pares de sueros y 5 monosueros. La respuesta monotípica para el serotipo 2 fue obtenida en 5 de los casos estudiados, de ellos 3 eran casos primarios

y 2 eran secundarios, y en todos correspondió a los sueros de la fase convaleciente que oscilaron entre 16 y 48 d después de comenzados los síntomas, lo cual explicaría la tendencia a la especificidad de la IgM en relación con el tiempo. También se observó, cuando se compararon los valores índices mediante el cálculo de la LSD, una diferencia significativa a favor del serotipo 2, esto corresponde al serotipo que circuló en el momento de tomadas las muestras.

Nicaragua, en 1985, reportó su primera epidemia de fiebre del dengue, donde se aislaron los serotipos 1 y 2.<sup>12</sup> Posteriormente se notificaron casos esporádicos hasta 1990. Después, en 1992 se produce otra epidemia y se aíslan los serotipos 2 y 4. En julio de 1994 se comenzó a observar un nuevo incremento en el número de casos de fiebre del dengue y de fiebre hemorrágica; se aisló el serotipo 3 en 2 niños hospitalizados.<sup>14</sup>

Se estudió un total de 33 muestras procedentes de casos de esta epidemia, cuyos resultados mostraron diferentes respuestas monotípicas: 2 fueron al dengue 1, 2 al dengue 3 y 1 al dengue 4. Esto corresponde a la alta endemicidad que ha mostrado este país desde 1985 con la circulación de los 4 serotipos. Los resultados obtenidos en el análisis del valor índice no mostraron diferencias significativas para ningún serotipo.

*Chungue* y otros en 1989<sup>15</sup> realizaron un estudio mediante la técnica de captura de IgM y señalaron su utilidad en ausencia del diagnóstico virológico, como un método presuntivo para la determinación del serotipo, basado en una respuesta monotípica y politípica homóloga dominante (respuesta a varios serotipos a la vez, pero predominando uno de ellos). Para ello realizaron el análisis del título relativo de anticuerpos IgM antidengue contra cada uno de los 4 antígenos. Pudieron diagnosticar infección por el virus dengue 4 en casos de infecciones primarias y secundarias que eran positivos de IgM, con una  $p < 0,01$ , usando sueros pares de pacientes con una infección a dengue 4 previamente conocida.

En este estudio se analizó la posibilidad de definir el serotipo circulante mediante el análisis de un grupo de sueros sobre la base de un valor índice, estos resultados permitieron conocer para el caso de Cuba, Costa Rica y Panamá el serotipo causante de las epidemias, no así en el caso de

Nicaragua cuya respuesta no fue estadísticamente significativa para un serotipo específico lo cual se explica por la amplia circulación de los 4 serotipos.

Como conclusión se puede señalar que este método basado en el valor índice, sin necesidad de titular, puede ser una alternativa para el diagnóstico virológico en aquellos laboratorios que lleven a cabo la vigilancia epidemiológica de la enfermedad, siempre que sean países donde no circulen más de 2 serotipos a la vez.

#### SUMMARY

A study of 4 groups of serum samples from Cuba, Costa Rica, Nicaragua and Panama was made to determine the serotypes of dengue virus causing epidemics or outbreaks by using IgM antibody-capture ELISA (MAC-ELISA). Dengue-IgM diagnostic kit was independently used in each of the serotypes and an index value was calculated (optical density of the sample/cut-off value) in each case, with which two statistical analyses were made: Fisher's variances and Litter significant difference (LSD) calculation. Such calculations allowed determining that in Cuba and Panama, serotype 2 circulated whereas in Costa Rica, serotype 1 prevailed. These were the isolated serotypes in various epidemics. Regarding Nicaragua, very heterogeneous responses were obtained, the responsible serotype could not be determined since more than two serotypes co-circulated in this country.

**Subject headings:** DENGUE VIRUS/diagnosis; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY; SEROLOGIC TESTS.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reiter P. La dengue dans les Amériques. *Bull Soc Path Ex* 1996;89(2):95-7.
2. Kourí G, Valdés A, Guzmán MG, Soler M, Bravo J. Epidemia de dengue en Nicaragua. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 1991;33(5):365-71.
3. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of

- serotype 3 in the Americas. *Pan Am J Public Health* 1997;1:193-9.
4. Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Souza R, Zagne S, Schtzmayer H. *Epidemiol Infect* 1993;11:163-70.
5. Bundo K, Igarashi A. Antibody-Capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J Virol Methods* 1985;11:15-22.
6. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchriya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(4):418-27.
7. Kourí G, Guzmán MG. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagnos Labor Immunol* 1996;3(6):621-7.
8. Kourí G, Guzmán MG, Valdés I, Carbonel I, Del Rosario D, Vázquez S. Reemergence of dengue in Cuba. A 1977 epidemic in Cuba. *Emerging Infect Dis* 1998;4(1):89-92.
9. Vázquez S, Sáenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Pan Am J Public Health* 1998;3(3):174-8.
10. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Amer J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
11. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Sixth edition, Tenth printing, 1979; Chapter 10: One-Way. Analysis of Variance, page 258.
12. Nawa M, Ichikawa Y, Inouye S. Serotyping of dengue viruses by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Japan. J Med Sci Biol* 1985;38:217-21.
13. Organización Panamericana de la Salud. Dengue en Costa Rica y Panamá. *Bol Epidemiol* 1994;9-10.
14. Dengue Type 3 Infection-Nicaragua and Panamá, October-November, 1994. *MMWR* 1995;44(2):
15. Chungue E, Boutin J, Roux J. Intérêt du titrage des IgM par technique immunoenzymatique pour le sérodiagnostic et la surveillance épidémiologique de la dengue en Polynésie Française. *Res Virol* 1989;140:229-40.

Recibido: 4 de febrero de 2002. Aprobado: 19 de marzo de 2002.  
Lic. *Iselys Delgado*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"  
Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico:svazquez@ipk.sld.cu