

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue

*Dra. María G. Guzmán<sup>1</sup> y Lic. Susana Vázquez<sup>2</sup>*

### RESUMEN

Se presentó una actualización sobre aspectos de interés relativos al diagnóstico virológico, serológico y molecular del dengue y su forma más severa, la fiebre hemorrágica del dengue, la cual se ha convertido en la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia médica.

**DeCS:** FIEBRE DENGUE HEMORRAGICA/transmisión; TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO; VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA.

Las enfermedades producidas por flavivirus transmitidos por mosquitos son hoy día consideradas infecciones reemergentes, por el incremento en la incidencia observada en los últimos años de la fiebre amarilla y principalmente del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (FHD).<sup>1-4</sup>

El complejo dengue está integrado por 4 serotipos (dengue 1, 2, 3 y 4), que son miembros de la familia Flaviviridae, género flavivirus y presentan una morfología y estructura genómica común. Estos agentes comparten determinantes antigénicos comunes entre todos los miembros de la familia Flaviviridae. Presentan además antígenos comunes y antígenos específicos propios de cada serotipo viral. Su ARN de simple cadena, de aproximadamente 11 kb y polaridad positiva codifica para 3 proteínas estructurales (envoltura, cápside y membrana) y 7 proteínas no estructurales.<sup>5</sup>

La extensión geográfica de la enfermedad hacia nuevas áreas, su incremento en el número de brotes y situaciones endémicas así como en su severidad, han conducido al desarrollo de sistemas de vigilancia para su prevención y control, en los que la confirmación de laboratorio ocupa un papel

prioritario.<sup>6</sup> El laboratorio puede brindar información temprana y precisa, a las autoridades de salud, lo que favorece la toma inmediata y oportuna de las medidas adecuadas para el control. Dada la emergencia y reemergencia del dengue y la FHD, su diagnóstico se convierte en un objetivo de primer orden para cualquier país, por la necesidad de diferenciar el dengue de otras enfermedades y como soporte a los sistemas de vigilancia de la enfermedad.

Su diagnóstico puede enfrentarse a través del aislamiento e identificación viral a partir de muestras de suero y/o muestras de autopsia, la demostración de un incremento de 4 veces o más del título de anticuerpos (IgG) en sueros pareados o la demostración de anticuerpos IgM a los antígenos del virus en un monosero, la demostración del antígeno viral por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y la detección del ácido nucleico viral en tejidos de autopsia y en muestras de suero.<sup>7</sup>

En la actualidad el diagnóstico del dengue está dirigido principalmente a la vigilancia epidemiológica y es una necesidad urgente el contar con métodos que permitan un diagnóstico temprano de la

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora Titular. Investigadora Titular.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Licenciada en Bioquímica. Profesora Titular. Investigadora Titular.

enfermedad y en consecuencia, la toma de medidas terapéuticas adecuadas para el tratamiento y control del paciente. Su utilidad principal actual radica en la detección de la circulación de alguno de los serotipos en un área geográfica determinada, caracterización de las cepas circulantes, estimación de la incidencia de la enfermedad una vez controladas las epidemias, confirmación de los casos de FHD y diagnóstico diferencial con otras entidades. Se necesitan métodos sensibles, específicos, rápidos, tempranos y baratos, que permitan por una parte el diagnóstico etiológico en el paciente y por otra brindar un pronóstico de la enfermedad.

### **MUESTRAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO**

Una vez que el individuo es picado por un mosquito infectado con cualquiera de los 4 serotipos, se produce un período de incubación intrínseca alrededor de 7-10 d de duración, durante el cual ocurre la replicación viral, que es máxima 2-3 d antes del comienzo de los síntomas y desaparece hacia el 5to.-6to. d de la enfermedad.<sup>5,8</sup> Para la detección del agente se recomienda la toma de muestras de sangre durante el período febril y sobre todo antes del 5to. d de comienzo de la enfermedad. El suero o plasma debe ser procesado casi inmediatamente o en su defecto almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En los fallecidos, deben obtenerse muestras de tejidos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre del ventrículo) lo antes posible, las que deben ser enviadas al laboratorio en condiciones de esterilidad, donde serán homogeneizadas y procesadas o almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento. Las muestras de tejidos fijadas en formalina y embebidas en parafina pueden ser utilizadas para la detección de antígenos, con la utilización de métodos inmunohistoquímicos o la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Las muestras que se envíen para aislamiento o detección del genoma viral deben ser transportadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .<sup>6,7,9</sup>

Para el diagnóstico serológico se recomienda la toma de una muestra de suero después del 5to. d de comienzo de los síntomas, para la determinación de anticuerpos IgM. El estudio de muestras pareadas de sueros (tomadas en los primeros 7 d

de comienzo de los síntomas y 14 a 21 d después) permite determinar el incremento en el título o la seroconversión de anticuerpos IgG.

Varios autores han demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG.<sup>10,11</sup> Este método se recomienda en estudios serológicos masivos, en la vigilancia serológica y en el estudio de muestras en niños pequeños. Recién se ha demostrado la utilidad de la saliva para la detección de anticuerpos IgM e IgG a dengue, se han observado niveles relativamente comparables a los observados en el suero de los pacientes, además se ha demostrado la utilidad de la detección de anticuerpos IgA para el diagnóstico de infección reciente.<sup>12,13</sup>

### **AISLAMIENTO VIRAL**

*Aislamiento viral en ratones:* los 2 métodos tradicionales de aislamiento del virus dengue son la inoculación de ratones recién nacidos y de cultivos celulares. Estos agentes pueden infectar a los ratones por diferentes vías, pero la más sensible es la intracerebral (ic), especialmente en animales de 1 a 2 d de nacidos en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central. Hoy día es considerado el método menos sensible para el aislamiento viral.<sup>7,14</sup> En general se recomienda inocular por vía ic, 0,02 mL del suero problema. Los animales deben ser observados al menos durante 21 d. La utilización de otras vías de inoculación, como la subcutánea e intraperitoneal junto a la ic y de 1 ó 2 pases ciegos en el mismo sistema, incrementan las posibilidades de aislamiento viral.

*Aislamiento viral en cultivos celulares y mosquitos:* la aplicación de los cultivos celulares en el aislamiento del virus dengue ha tenido como consecuencia un incremento en la sensibilidad del aislamiento, aunque hasta el presente no existe un sistema de células de mamífero o mosquitos que sea capaz de inducir la producción de efecto citopático (ECP) de todas las cepas del virus. La línea celular LLCMK2 (riñón de mono) es la más sensible entre las líneas de células de mamífero, aunque esta sensibilidad varía en dependencia del

serotipo y de las cepas virales. Otras líneas de células de mamífero como las Vero (riñón de mono) y BHK21 (riñón de hámster) también han sido utilizadas con algún éxito en el pasado. En general, todas requieren de un período de adaptación hasta lograr títulos virales aceptables.<sup>7,9</sup>

La demostración por *Singh y Paul* en 1969 de que los 4 serotipos podían ser multiplicados en una línea celular obtenida a partir de larvas de mosquitos *Aedes albopictus*, representó un paso de avance en el aislamiento de estos agentes.<sup>15</sup> A partir de este hallazgo, otras líneas celulares de mosquitos se han desarrollado como la AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Tra-284 (*Toxorynchites amboinensis*), C636 (*Aedes albopictus*). Estas líneas celulares han dado lugar a diferentes clones como AP64 y CLA-1 (clonos de la línea celular AP61) y la C636 HT (clono de la C636 adaptada a crecer a 33 °C) que muestran diferentes grados de susceptibilidad al dengue.<sup>16-18</sup>

Las células de mosquitos son más sensibles que las de mamíferos, relativamente fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio e incluso a temperatura ambiente y pueden mantenerse durante 14 d sin cambio de medio. Pueden a su vez ser utilizadas en condiciones de campo y ser inoculadas directamente con el suero de pacientes.

Aunque cepas de los 4 serotipos son capaces de inducir la formación de efecto citopático (ECP), como formación de sincitios, presencia de células gigantes multinucleadas y fagocitosis, su presencia en general es variable. Actualmente, las células de línea de mosquitos son las más sensibles y las más utilizadas en el diagnóstico de rutina del dengue.<sup>7,9</sup>

La inoculación de mosquitos es la técnica de mayor sensibilidad y el método de elección para el aislamiento del dengue en muestras de importancia, en especial en muestras de fallecidos. El *Aedes albopictus* y *Toxorynchites amboinensis* han demostrado ser de gran utilidad en el aislamiento de estos agentes.<sup>7,9,19,20</sup> La inoculación de mosquitos *Aedes albopictus* es de mayor sensibilidad para la detección del dengue que las células LLCMK2. La utilización de larvas de *Toxorynchites amboinensis* es el método de aislamiento más rápido y sensible. A pesar de la elevada sensibilidad de los mosquitos como sistema de aislamiento, la inoculación de los cultivos celulares de mosquitos es el método más utilizado en el diagnóstico de

rutina del dengue, por su adecuada sensibilidad y la posibilidad de procesar un elevado número de muestras a relativamente bajo costo.<sup>9</sup> Por último, la inoculación de mosquitos requiere de facilidades especiales para el establecimiento y mantenimiento de las colonias, así como cierto grado de entrenamiento técnico.

## IDENTIFICACIÓN VIRAL

El desarrollo de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos de serotipo ha posibilitado el desarrollo de un método rápido, simple y económico para la identificación de los virus del dengue con la utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), independientemente del sistema biológico utilizado para el aislamiento viral. *Henchal* y otros, han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos de grupo (flavivirus), complejo (dengue), subcomplejo y tipo.<sup>21</sup> Estas 4 clases de monoclonales, de diferente especificidad, han sido capaces de identificar aislamientos procedentes de diferentes áreas geográficas, tanto por IFI como por la técnica de neutralización por reducción de placas.

En general, el principal problema asociado con la identificación de los virus del dengue en los cultivos celulares con la utilización de anticuerpos monoclonales es la pobre replicación del virus, que resulta en una baja concentración viral en ocasiones. Por tal razón, la identificación en la siembra primaria es en algunos casos imposible, por lo que se necesitan 1 ó 2 pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar la concentración viral.<sup>22</sup>

Para el diagnóstico de rutina se recomienda la inoculación de muestras de suero diluidas 1/30 e inoculadas en volúmenes de 0,1 mL en monocapas de células C6-36/HT sembradas en tubos. Después de 30 min de adsorción a 33 °C se añade el medio celular de mantenimiento. Las células son observadas diariamente y al día 10 se realiza la cosecha y después la IFI. La utilización de un anticuerpo policlonal (líquido ascítico hiperinmune de ratón o un suero humano de alto título de anticuerpos a dengue) permite realizar un pesquiasaje inicial para detectar las muestras positivas. Una segunda inmunofluorescencia, con la utilización de

anticuerpos monoclonales a cada uno de los 4 serotipos del virus, permite la tipificación del serotipo. Estudios recientes recomiendan la centrifugación durante 30 min a 1 500-2 000 rpm de la muestra, una vez inoculada sobre la monocapa celular, lo que incrementa la rapidez y la frecuencia de aislamiento viral; este método logró 16 % más de aislamiento viral cuando se comparó al sistema usual, por otra parte 42 % de los aislamientos se detectaron al segundo día de la inoculación.<sup>23</sup> La utilización de esta metodología ha permitido lograr niveles elevados de aislamiento viral en muestras de tejido de fallecidos por FHD.<sup>24</sup>

#### DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

En el dengue se observan principalmente 2 tipos de respuesta serológica: primaria y secundaria. La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a flavivirus. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue, los que han padecido previamente una infección por flavivirus.<sup>8,25</sup> La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de los 4 serotipos virales posibilita que se produzcan incluso infecciones terciarias y cuaternarias.

En los individuos que sufren su primoinfección, los anticuerpos IgG antidengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5to.-6to. d de comienzo de los síntomas, los cuales son máximos hacia los 15-21 d. Después declinan y permanecen detectables poco más o menos durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas; permanecen elevados durante varias semanas y luego van declinando. Esta elevación significativa permite el diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad.<sup>5,6,26</sup>

Los anticuerpos IgM antidengue que se producen en respuesta a la infección se desarrollan rápidamente y hacia el 5to. d de la enfermedad la mayoría de los individuos presentan cantidades detectables. En general, estos anticuerpos IgM declinan hacia niveles no detectables entre los 30-90 d

del comienzo de los síntomas. Se ha observado que un pequeño número de individuos que sufren una infección secundaria por dengue, pueden no presentar niveles de anticuerpos IgM.<sup>9</sup> La concentración, especificidad y duración de los anticuerpos IgM antidengue es variable y depende en gran medida del individuo. *Guzmán* y otros (comunicación personal) han detectado anticuerpos IgM en 56 % de los casos hacia el 5to. d de comienzo de los síntomas, se eleva a 95 % entre el 6to.-10mo. d de la enfermedad. En general, los anticuerpos IgM muestran algún grado de reactividad cruzada entre los serotipos del dengue, independientemente de la severidad de la enfermedad y el tipo de infección (primaria o secundaria). Estudios no publicados han demostrado que solo entre 14 a 17 % de los sueros estudiados mostraron especificidad de serotipo en relación con el tipo de infección (primaria o secundaria) o el cuadro clínico (fiebre dengue o FHD) (*Guzmán*, datos no publicados). También se ha observado cierto grado de reactividad cruzada con otros flavivirus como fiebre amarilla (FA) y encefalitis japonesa.<sup>5</sup> *Vázquez* y otros, demostraron que en general se observa cierto grado de reactividad cruzada de los anticuerpos IgM de dengue frente al antígeno de FA, y que es mucho menor la reactividad cruzada de anticuerpos IgM a FA en relación con el dengue.<sup>27</sup>

El diagnóstico serológico del dengue es complicado, por causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los 4 serotipos y los flavivirus en general. Por otra parte, considerando su presencia y los elevados niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan una infección de tipo secundaria, el estudio de monosueros tomados en la fase aguda o en la convaleciente temprana puede ser de utilidad como criterio de caso probable o presuntivo de dengue.<sup>6</sup>

Los virus del dengue son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso; esto ha permitido que la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) sea aplicada en el estudio serológico de monosueros y pares de sueros, con la utilización de antígenos de los 4 serotipos producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa acetona.<sup>9,28</sup> Un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos en un par de sueros

es criterio diagnóstico para una infección reciente por flavivirus, por otra parte títulos de anticuerpos  $IH^3$  1/2560 es el criterio más ampliamente utilizado para clasificar un caso como secundario. Por último, títulos elevados (1/1280) en monosueros es criterio de infección probable por dengue.<sup>6</sup>

Dependiendo de la situación epidemiológica en diferentes áreas geográficas, los criterios pueden variar. *Kourí* y otros demostraron que al menos en las condiciones epidemiológicas de Cuba, en el año 1981, títulos de anticuerpos  $IH^3$  1/1280 eran criterio de infección secundaria.<sup>29</sup> Por su parte *Vázquez* y otros demostraron que títulos de anticuerpos totales a dengue de 1/5120 son criterio de infección probable por dengue y títulos  $IH^3$  1/10240 criterio de infección secundaria a dengue cuando se utiliza como sistema de detección de los anticuerpos el método de ELISA de inhibición (MEI).<sup>30</sup>

La prueba de neutralización por reducción de placas (PNRP) es un ensayo sensible y específico, que permite la detección de anticuerpos neutralizantes al virus dengue. Estos anticuerpos son muy estables en el tiempo. Se ha reportado que en un individuo con una infección de tipo secundaria, el título de anticuerpos neutralizantes al primer serotipo que produjo la infección primaria, es anamnesticamente mayor que contra el serotipo infectante durante la segunda infección (“fenómeno del pecado original”). Hace poco otros autores han reportado que la teoría del pecado original no puede aplicarse en su totalidad al serodiagnóstico, porque pueden observarse resultados discrepantes entre la neutralización y el aislamiento viral en individuos donde se conocen los serotipos infectantes de la primera y segunda infección.<sup>31</sup>

La PNRP es considerada de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos por su elevada especificidad, lo que permite identificar el serotipo causante de una infección pasada.<sup>32-34</sup> También ha sido utilizada en la identificación de los virus del dengue.

Tanto la  $IH$  como la PNRP requieren de muestras de sueros pareadas en los casos sospechosos de la enfermedad, así como destreza en su ejecución. En general son técnicas demoradas en su ejecución.

En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas inmunoenzimáticos (ELISA)

para el diagnóstico del dengue. Estos son económicos, rápidos y fáciles de ejecutar. Muestran a su vez elevada sensibilidad y especificidad cruzada, lo que los hace de gran utilidad como pruebas de “tamizaje”.<sup>35-45</sup> Diferentes ELISA desarrollados para determinar la presencia de anticuerpos totales antilavivirus han demostrado su utilidad en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico serológico. *Vázquez* y *Fernández*, en 1989, desarrollaron un sistema inmunoenzimático que permite la detección y titulación de inmunoglobulinas totales a virus dengue, mediante un sistema de inhibición donde una vez añadido el antígeno, la presencia de color en la reacción dependerá de la presencia o no de anticuerpos a dengue en el suero problema.<sup>35,36</sup> El enlace al antígeno de los anticuerpos antidengue, presentes en el conjugado, será inhibido si en el suero problema (añadido con anterioridad) están presentes anticuerpos al agente en cuestión. Este sistema permite la detección de anticuerpos en suero y en muestras de sangre colectadas en papel de filtro y ha sido aplicado con éxito durante años a la vigilancia y los estudios serológicos de dengue en Cuba.

El ELISA de captura de IgM se ha constituido en uno de los sistemas más importantes y útiles del diagnóstico y la vigilancia del dengue. Los anticuerpos IgM antidengue se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente por dengue. Los anticuerpos se desarrollan con rapidez y al 5to. d de la enfermedad y en la mayoría de los pacientes se detectan anticuerpos IgM.

La detección de anticuerpos IgM se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la vigilancia del dengue y de la FHD; resulta el método de elección en la mayoría de los laboratorios. Diferentes estuches han sido desarrollados recientemente con diferentes grados de sensibilidad y especificidad.<sup>38,43</sup> La mayoría de los sistemas se basan en un ELISA de captura de anticuerpos IgM que incluyen los 4 serotipos virales, lo que incrementa la sensibilidad al sistema. Un estuche de captura de IgM (dengue IgM) y un sistema ultramicroanalítico que utiliza solo 10 mL de muestra han sido desarrollados por investigadores cubanos, los que son utilizados en el diagnóstico y la vigilancia de dengue en varios

países y muestran niveles de sensibilidad y especificidad elevados.<sup>11</sup>

Recientemente se ha desarrollado un sistema visual de tira reactiva (PanBio) que permite la detección de anticuerpos IgM en menos de 5 min. El sistema, que se basa en una cromatografía, muestra niveles de sensibilidad y especificidad de 99 y 96 %, respectivamente.<sup>38,42,43</sup>

*Talarmin* y otros<sup>45</sup> demostraron la utilidad de la detección de anticuerpos IgA para el estudio de la infección reciente de dengue. El sistema mostró 100 % de sensibilidad y especificidad al compararlo al ELISA de captura de IgM, aunque esta última se detectó como promedio a 3,8 d de comienzo de los síntomas y la IgA a 4,6.

#### DETECCIÓN MOLECULAR

La hibridación de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos, específicamente el *dot/blot* con la utilización de ARN extraído de células infectadas con el virus y de *pooles* de mosquitos *Aedes albopictus* infectados con probes biotinilados o probes marcados con P<sup>32</sup>. La detección mediante probes biotinilados es menos sensible que la que utiliza probes marcados con isótopos radiactivos y no es de gran utilidad en la identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que se haya realizado una amplificación previa del material genético.<sup>46-50</sup>

Cebadores específicos de tipo y de complejo han sido utilizados a partir de secuencias consenso localizadas en diferentes genes, como los que codifican para las proteínas de la envoltura (E), NS1, NS2 y NS5, así como los extremos 3' y 5' no codificantes.<sup>51,52</sup> *Lanciotti* y otros (1992) desarrollaron una RCP rápida con la utilización de cebadores consenso localizados en los genes C y prM.<sup>53</sup> Esta primera RCP produce un fragmento de 511 pb, la cual es seguida de una RCP *nested* donde se utilizan cebadores específicos para cada serotipo. Este método ha demostrado su utilidad en el diagnóstico del dengue, presenta una sensibilidad de hasta 10<sup>3</sup> DICT50 en sueros virémicos y mosquitos infectados.

La RCP es ampliamente utilizada en el diagnóstico del dengue porque permite la

detección del agente de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares y en larvas infectadas, así como en muestras de tejidos frescos y embebidas en parafina en fallecidos por FHD.<sup>54-</sup>

<sup>58</sup> A su vez ha permitido determinar la presencia de infecciones concurrentes por 2 serotipos. Hace poco, la RCP permitió la detección e identificación en menos de 6 h del virus dengue 2 en muestras de suero y tejidos en pacientes de dengue y FHD, procedentes del brote de Santiago de Cuba de 1997.<sup>24</sup> En este mismo brote se demostró la presencia del agente en 81 % de las muestras de tejido de fallecidos procesadas, a diferencia del aislamiento viral que solo logró 43 %.<sup>24</sup> Antes, se había detectado la presencia de dengue 2 en muestras de suero y tejidos embebidos en parafina de pacientes de dengue y FHD, procedentes de la epidemia de Cuba de 1981, las que habían permanecido guardadas por más de 16 años.<sup>59,60</sup>

Además de su utilidad como un método de diagnóstico rápido, también ha sido empleado en el estudio genómico de cepas de dengue, lo que permite por medio del análisis mediante enzimas de restricción o secuenciación nucleotídica la clasificación de las cepas en genotipos.<sup>59-65</sup> Mediante la utilización de la RCP y la secuenciación nucleotídica se pudo determinar el genotipo de las cepas de dengue 1 y 2, aisladas en los brotes ocurridos en Cuba en los años 1977, 1981 y 1997; así como el posible origen geográfico de la cepa de dengue 3 que se reintrodujo en la región de las Américas en 1994.<sup>65,66</sup> Por último, la combinación de ambas metodologías permitió confirmar el genotipo de la cepa de dengue 2 causante de la epidemia de FHD de 1981, a partir del estudio en muestras de hígado embebidas en parafina que habían sido guardadas por más de 16 años.<sup>60</sup>

Algunos reportes aparecen demostrando la utilidad de la RCP en la vigilancia de esta enfermedad, ya sea para detectar con rapidez la introducción de un nuevo serotipo en un área mediante el estudio de muestras de sueros de pacientes y de *pooles* de mosquitos *Aedes*.<sup>58,67-70</sup> *Chow* y otros<sup>70</sup> como parte de la vigilancia epidemiológica en Singapur, estudiaron 309 *pooles* de mosquitos *Aedes aegypti* durante 1 año y demostraron en 20 % de estos la presencia de

dengue 1. Además de la detección del genoma viral como método diagnóstico, su cuantificación es de gran importancia como un marcador de severidad de la enfermedad. Recién se han reportado varios estudios que han abierto la posibilidad de cuantificar el ADNc viral. *TaqMan*, *Laue* y otros<sup>71</sup> aplicaron un protocolo de amplificación automatizado que permitió medir la cantidad de ADNc durante el proceso de amplificación. Por su parte Huo-Shu y otros desarrollaron un RT-PCR fluorogénico que permitió cuantificar el material amplificado.<sup>72</sup>

## DETECCIÓN ANTIGÉNICA

Un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue es la detección directa del antígeno viral en el suero del paciente o en muestras de tejidos de fallecidos, con la utilización de sistemas inmunoenzimáticos y técnicas inmunohistoquímicas. En general los sistemas inmunoenzimáticos muestran baja sensibilidad, sobre todo cuando se estudian muestras procedentes de individuos que sufren una segunda infección por dengue.<sup>73,74</sup> Recientemente, *Malergue* y otros han desarrollado un sistema inmunoenzimático que utiliza anticuerpos de ratón antidengue biotinilados y estreptavidina marcada con B galactosidasa.<sup>75</sup> Con la utilización de este sistema para detectar el antígeno viral en muestras de sueros de pacientes, se lograron cifras de sensibilidad y especificidad que oscilaron entre 89-90 % y 94-99 %, en dependencia del protocolo utilizado. Varios autores<sup>76</sup> han demostrado que el antígeno viral se detecta con una mayor sensibilidad cuando se utilizan como muestra linfocitos de sangre periférica (53,8 %) en lugar de suero (18,9 %). Por último, *Young* y otros sugieren que la detección de la proteína NS1 en suero de los pacientes pudiera servir como un marcador para medir la viremia.<sup>77</sup>

El desarrollo de sistemas inmunohistoquímicos y de la RCP ha ocasionado un incremento en la calidad del diagnóstico en los casos fatales de FHD/SCD, aunque todavía ambos sistemas no se encuentran disponibles en la mayoría de los laboratorios que asumen el diagnóstico de rutina.<sup>78,79</sup> La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas, con la utilización de anticuerpos policlonales y monoclonales antidengue, permitió confirmar una

vez más el diagnóstico de dengue 2 en muestras embebidas en parafina, procedentes de pacientes fallecidos por FHD/SCD de las epidemias cubanas de 1981 y 1997 (Arteaga E, datos no publicados)

## CONCLUSIONES

Hoy día el diagnóstico del dengue puede abordarse mediante el aislamiento viral, la detección del antígeno y el genoma viral en muestras de sueros, tejidos y *pooles* de mosquitos; así como por la detección de anticuerpos IgM o IgG que permiten el diagnóstico de una infección reciente o pasada. La aplicación en su conjunto de las técnicas enumeradas permite que los laboratorios que asumen el diagnóstico de rutina y la vigilancia puedan brindar un diagnóstico rápido y temprano de la situación epidemiológica presente en sus respectivos países.

## SUMMARY

Some aspects of interests connected with the virological, serological and molecular diagnosis of dengue and its most severe form, dengue hemorrhagic fever, which has turned into the most important arthropod-borne viral disease, are updated.

**Subject headings:** DENGUE HEMORRHAGIC FEVER/ transmission; TECHNIQUES AND PROCEDURES; EPIDEMIOLOGIC SURVEILLANCE.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:480-96.
2. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51:5-13.
3. Jacobs M. Dengue: emergence as a global health problem and prospects for control. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2000;94:7-8.
4. Guzmán MG, Kourí G. Dengue-an update. *The Lancet Infectious Dis* 2002;2: 33-42.
5. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.* editores. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott. Raven Publishers;1996.
6. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington: Pan American Health Organization; 1994. (Scientific publication No. 548.)
7. Guzmán MG, Kourí G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1996;6:621-7.
8. Halstead SB. Dengue Viruses. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow MR editores. *Infectious Diseases*; Philadelphia: Saunders.
9. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler DJ, Kuno G editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, 1997.

10. Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Detection of IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Pub* 1998;3:174-8.
11. Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991;33:309-11.
12. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:3737-9.
13. Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien E, Deubel V, Vorndam V, *et al.* Diagnostic value of dengue virus specific IgA and IgM serum antibody detection. *Micro Infect* 1999;1:1085-90.
14. Guzmán MG, Kourí G, Soler M, Morier L, Vázquez S. Aislamiento del virus dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2. *Rev Cubana Med Trop* 1984;36:4-10.
15. Singh KRP, Paul SD. Isolation of dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. *Bull WHO* 1969;40:982-3.
16. Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines of dengue viruses. *Bull WHO* 1985;63:279-86.
17. Morier L, Castillo A, Rodríguez R, Guzmán MG. Utilidad de la línea celular CLA-1 para el aislamiento del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47:217-8.
18. Morier L, Alemán MR, Castillo A, Pérez V. Estudio preliminar de la línea celular AP64 (*Aedes pseudoscutellaris*) para la multiplicación de los virus dengue 1 y 2. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43:156-61.
19. Gubler D, Rosen L. A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg* 1976;25:146-50.
20. Lam SK. Isolation of dengue viruses by intracerebral inoculation of mosquito larvae. *J Virol Methods* 1986;14:133-40.
21. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:164-9.
22. Soler M, Guzmán MG, Morier L, Kourí G. Utilización de los anticuerpos monoclonales para la identificación mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de varias cepas de dengue aisladas durante la epidemia de fiebre hemorrágica, Cuba, 1981. *Rev Cubana Med Trop* 1985;37:246-51.
23. Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kourí G. Isolation of dengue 2 in C636/HT cells by rapid centrifugation/shell vial assay. Comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol* 2000;38:3508-10.
24. Guzmán MG, Álvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Valdés L, *et al.* Dengue hemorrhagic fever fatal cases in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999;3:130-5.
25. Halstead SB. Pathophysiology and pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. New Delhi: World Health Organization.
26. Kourí G, Más P, Guzmán MG, Soler M, Goyenechea A, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *PAHO Bull* 1983;17:126-32.
27. Vázquez S, Valdés O, Pupo M, Delgado I, Álvarez M, Pelegrino JL, *et al.* MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for antibodies detection on yellow fever vaccinated individuals. *J Virol Methods* (submitted).
28. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
29. Kourí G, Guzmán MG, Bravo J. Criterios utilizados durante la epidemia de dengue hemorrágico para definir los casos positivos y las respuestas primarias y secundarias en la prueba de inhibición de la hemaglutinación. *Rev Cubana Med Trop* 1983;35:4-10.
30. Vázquez S, Bravo J, Pérez AB, Guzmán MG. ELISA de Inhibición: su utilidad para clasificar un caso de dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49:108-12.
31. Kuno G, Gubler DJ, Oliver A. Use of "original antigenic sin" theory to determine the serotypes of previous dengue infections. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1993;87:103-5.
32. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Martínez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic fever Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1991;86:367.
33. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Vázquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:179-84.
34. Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Álvarez M, Vázquez S, Delgado I, Halstead S. Epidemiology studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000;152:793-9.
35. Vázquez S, Fernández R. Utilización de un método de Inhibición de ELISA en el diagnóstico serológico del dengue. Reporte Preliminar. *Rev Cubana Med Trop* 1989;41:18-26.
36. Fernández R, Vázquez S. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1990;85:347-51.
37. Johnson AJ, Martin DA, Karabatsos N, Roehrig JT. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay *J Clin Microbiol* 2000;38:1827-31.
38. Palmer C, King D, Cuadrado RR, Pérez E, Baum M, Ager A. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. *J Clin Microbiol* 1999;37:1600-1.
39. Wu SJL, Paxton H, Hanson B, Kung CG, Chen TB, Rossi C, *et al.* Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:106-10.
40. Schwartz E, Mileguir F, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of ELISA-based serodiagnosis of dengue fever in travelers. *J Clin Virol* 2000;19:169-73.
41. Miagostovich MP, Nogueira RMR, dos Santos FB, Schatmayr HG, Araujo ESM, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol* 1999;14:183-9.
42. Sang CT, Hoon LS, Cuzzubbo A, Devine P. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1998;5:407-9.
43. Chakravarti A, Gur R, Berry N, Mathur MD. Evaluation of three commercially available kits for serological diagnosis of dengue haemorrhagic fever. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000;36:273-4.
44. Nawa M, Takasaki T, Yamada K, Akatsuka T, Kurane I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods* 2001;92:65-70.
45. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol* 1998;36:1189-92.
46. Deubel V. Recent advances and prospective researches on molecular epidemiology of dengue viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1992;87:133-6.



47. Deubel V. The Contribution of Molecular Techniques to the Diagnosis of Dengue Infection. En: Gubler DJ, Kuno G editores. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CAB International; 1997.
48. Killen H, O'Sullivan MA. Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J Virol Methods* 1993;41:135-146.
49. Chandler LJ, Blair CD, Beaty BJ. Detection of dengue 2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J Clin Microbiol* 1993;31:2641-7.
50. Ruiz BH, Zamora MP, Liu S. Detection of dengue viral RNA by microplate hybridization. *J Virol Methods* 1995;54:97-108.
51. Chow VTK, Yong RYY, Ngho BL, Chan YC. Automated type specific ELISA probe detection of amplified NS3 gene products of dengue viruses. *J Clin Pathol* 1997;50:346-9.
52. Sudiro TM, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanaroj S, *et al.* Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase polymerase chain reaction using 3'noncoding region universal primers. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:424-9.
53. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:545-51.
54. Figueiredo LTM, Batista WC, Igarashi A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1997;92:395-8.
55. Rosario D, Álvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodríguez R, Vázquez S, *et al.* Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo de virus del dengue en muestras clínicas. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 4:1-5.
56. Rosario D, Suárez C, Rodríguez R, Soler M, Guzmán MG. Identificación rápida de los serotipos del dengue mediante PCR. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48: 155-60.
57. Harris E, Roberts G, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, *et al.* Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2634-9.
58. Rosario D, Álvarez M, Vázquez S, Amin N, Rodríguez R, Valdés K, Guzmán MG. Application of molecular methods to the diagnosis and characterization of a dengue outbreak in Cuba. *Rev Biotecnol Aplicada* 2001;18:1-4.
59. Álvarez M, Guzmán MG, Rosario D, Vázquez S, Pelegrino JL, Sariol C, Kourí G. Secuenciación directa a partir de un producto de PCR de una muestra de suero de la epidemia de FHD de 1981. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48:53-5.
60. Sariol CA, Pelegrino JL, Martínez A, Arteaga E, Kourí G, Guzmán MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61: 994-1000.
61. Vorndam V, Nogueira RMR, Trent DW. Restriction analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol* 1994;136:191-6.
62. Vorndam V, Kuno G, Noemi R. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methods* 1994; 48:237-44.
63. Chungue E, Cassar O, Drouet MT, Guzmán MG, Laille M, Rosen L, *et al.* Molecular epidemiology of dengue 1 and dengue 4. *J Gen Virol* 1995;76:1877-84.
64. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Green S, *et al.* Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:96-101.
65. Guzmán MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, Kourí G. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue 2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:241-6.
66. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G, *et al.* Dengue en Nicaragua, 1994: reintroducción del serotipo 3 en las Américas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996;121:102-10.
67. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonell I, Rosario D, Vázquez S, *et al.* Reemergence of dengue in Cuba: A 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998;4:89-92.
68. Valdés L, Guzmán MG, Kourí G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, *et al.* La epidemiología del dengue y el dengue hemorrágico en Cuba, 1997. *Rev Panam Salud Pub* 1999;6:16-24.
69. Ahmad R, Ismail A, Saat Z, Lim LH. Detection of dengue virus from field *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28:138-42.
70. Chow VTK, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, *et al.* Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:578-86.
71. Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan Automated Amplification System. *J Clin Microbiol* 1999;37:2543-7.
72. Huo-Shu H, Hritz D, Kanasa N. Quantitative detection of dengue 2 using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J Virol Methods* 2000; 86:1-11.
73. Monath TP, Wands JR, Hill LJ, Gentry MK, Gubler DJ. Multisite monoclonal immunoassay for dengue viruses: detection of viraemic human sera and interference by heterologous antibody. *J Gen Virol* 1986;67:639-50.
74. Sithiprasasna R, Strickman D, Innis BL, Linthicum KJ. ELISA for detecting dengue and Japanese viral antigen in mosquitoes. *Annals Trop Med Parasitol* 1994;88:397-404.
75. Malergue F, Chungue E. Rapid and sensitive streptavidin-biotin amplified fluorogenic enzyme-linked immunosorbent-assay for direct detection and identification of dengue viral antigens in serum. *J Med Virol* 1995;47:43-7.
76. Kittigul L, Meethien N, Sujirarat D, Kittigul C, Vasanavat S. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. *Asian Pacific J Allergy Immunol* 1997;15:187-91.
77. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:1053-7.
78. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodríguez AJ, González E, Frontela MC, Guzmán MG. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49:100-7.
79. Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:720-4.

Recibido: 19 de abril de 2002. Aprobado: 23 de julio de 2002.  
 Dra. María G. Guzmán. Departamento de Virología. Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio de las Enfermedades Víricas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía, Km 6, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 53-7-220633 y 53-7-246051. Correo electrónico: lupe@ipk.sld.cu y svazquez@ipk.sld.cu