

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CAMPECHE
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES TROPICALES

Caracterización clínica y de laboratorio de un brote de dengue en un área rural de Campeche, México

Tayde Josefina Sosa Cabrera¹ y Marlene Santos Pérez²

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: se describe la primera epidemia de dengue detectada en una zona rural del estado de Campeche, México, entre los meses de octubre-diciembre de 1997, que coincidió con la introducción del serotipo dengue 3 en el estado. La población de la pequeña comunidad afectada, conformada por 214 habitantes, es de origen maya, con un nivel socioeconómico bajo. **OBJETIVOS:** describir las características de un brote de dengue ocurrido en un área rural, conocer sus formas clínicas e identificar los serotipos en 10 casos de fiebre por dengue. **MÉTODOS:** los casos clínicos fueron clasificados siguiendo las guías de la OPS/OMS. La infección por dengue fue confirmada mediante la técnica MAC-ELISA de captura y se estableció la presencia de infección primaria o secundaria por la prueba de neutralización por reducción del número de placas. **RESULTADOS:** de los 53 casos confirmados por serología, 50 (94,3 %) evolucionaron con fiebre por dengue y 3 (5,7 %) con fiebre hemorrágica por dengue, de los cuales 2 fallecieron. En 62,3 % (33/53) de los casos se observaron manifestaciones hemorrágicas (epistaxis, petequias y gingivorragia). Resultaron 30 individuos menores de 20 años, 12 fluctuaron entre los 21 a 40 años y 11 eran mayores de 50 años. Se detectó en 6 individuos infección secundaria y en 1 infección primaria, esto indica que ha habido circulación previa de los virus dengue en esta región. **CONCLUSIONES:** por primera vez se reporta un brote en un área rural del estado de Campeche, México, el cual se relacionó con la introducción del serotipo 3 en la región; el elevado número de casos de fiebre por dengue con manifestaciones hemorrágicas y los 3 casos hemorrágicos hace suponer que pudo tratarse de una cepa viral más agresiva, por lo que sería importante caracterizar genéticamente los virus del dengue que estén circulando en el estado.

Palabras clave: Dengue, epidemia, área rural, serotipos, México.

INTRODUCCIÓN

El dengue es la más importante infección viral transmitida por artrópodos en el hombre; la infección por este Flavivirus causa un amplio espectro de trastornos clínicos desde infección asintomática, fiebre indiferenciada, fiebre del dengue (FD), hasta las formas severas que se caracterizan por fiebre hemorrágica del dengue (FHD) o síndrome de choque del dengue (SCD), o ambas.

El incremento de la incidencia del dengue, las epidemias de los últimos años, así como la

circulación de múltiples serotipos han sido factores responsables de la emergencia y diseminación de FHD/SCD en el Caribe y Latinoamérica.

Actualmente los 4 serotipos del virus dengue circulan con regularidad en las Américas y al menos en 14 países se ha registrado la presencia simultánea de más de un serotipo en la población.¹ Una interesante observación fue la temporal desaparición del serotipo DEN-3 que fue aislado por última vez en 1977-1978 en Colombia y Puerto Rico, respectivamente, desapareciendo hasta 1994, cuando fue aislado en Nicaragua y Panamá.² En 1995

¹ Licenciada en Medicina. Profesora e Investigadora Titular. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad Autónoma de Campeche (UAC), México.

² Licenciada en Química Farmacéutica y Biología. Investigadora Auxiliar. UAC. México.

este virus se expandió a países de América Central y México, donde resulta el responsable de importantes brotes epidémicos en este país.³

En el estado de Campeche los primeros casos de dengue registrados fueron ocasionados por el serotipo DEN-1 en 1980, donde se reporta endémico en toda la región, y a partir de 1995 se detectaron los primeros casos de fiebre hemorrágica del dengue.⁴

En este trabajo se describe el primer brote de dengue ocurrido en una área rural del estado de Campeche, México; que resulta un indicador de alarma de la distribución del vector y de los virus del dengue en la región.

MÉTODOS

Área del estudio: el ejido “La Lucha” perteneciente al municipio de Calakmul, área enclavada en una zona selvática del estado de Campeche, se localiza entre las coordenadas geográficas extremas de los paralelos 19° 12' y 17° 48' de latitud norte, así como los meridianos 89° 09' y 90° 29' de longitud oeste de Greenwich. Este municipio colinda al norte con el Municipio de Hopelchén, al sur con la República de Guatemala, al este con el Estado de Quintana Roo y Belice y al oeste con los municipios de Carmen y Escárcega. Esta pequeña localidad estaba conformada por 214 habitantes en el momento del brote.

Manifestaciones clínicas y pruebas de laboratorio: los casos clínicos fueron clasificados siguiendo las guías de la OPS/OMS.⁵ La infección por dengue fue confirmada por serología mediante la técnica MAC-ELISA de captura de IgM a virus dengue y por la *prueba de neutralización por reducción* del número de placas se estableció la presencia de una infección primaria o secundaria.

Toma de muestra: previo consentimiento del paciente, se tomó una muestra sanguínea por punción venosa alrededor de 5 mL. Posteriormente fueron transportadas en frío a 4 °C al laboratorio y una vez separado el suero, estos fueron procesados. Las muestras fueron obtenidas dentro de los primeros 5 a 10 d de haberse iniciado la fiebre.

ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM a dengue (MAC-ELISA): se empleó el método propuesto por Kuno.⁶ A las

placas de poliestireno de 96 pozos (IMMULON) se le agregó 100 µL de Igs anti-IgM humanas (Laboratorios Kirkegaard & Perry) diluidas con solución de carbonato-bicarbonato pH 9,6 y fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche, se lavó 5 veces con PBS (*buffer* fosfato salino pH 7,4). Se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) 4 % en fosfato salina pH 7,2; se incubó a 37 °C durante 15 min. Seguidamente se agregaron los sueros diluidos 1/40 en 0,5 % BSA-PBS, y se dejó en incubación durante 2 h a 37 °C y se lavó la placa 5 veces con PBS; después se añadió mezcla de antígenos de los 4 serotipos de virus dengue (Lab. de Arbovirus, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí) y se mantuvieron las placas a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa 5 veces con PBS y se añadió el monoclonal 6B6C-1 conjugado a peroxidasa de rábano (HPR) (*Jackson Immunol Research*) se incubó durante 1 h a 37 °C, se lavó 7 veces con PBS, se añadió el sustrato ABTS (Laboratorios Kirkegaard & Perry) y se dejó en incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Se leyó en espectrofotómetro a 410 nm. Se consideraron positivos todos aquellos sueros que dieron una lectura $\geq 0,200$ recomendado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Prueba de neutralización por reducción del número de placas (PNRP): se utilizó el método descrito por *Morens*⁷ y *Álvarez*.⁸ Se determinó en las muestras la presencia de los anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del virus dengue en células BHK₂₁. Se empleó para el serotipo DEN-1 la cepa Angola 4PC/36 2PVERO; para el serotipo DEN-2 la cepa A15 4PR 1PC6/36; para el serotipo DEN-3 la cepa 116/00 2PC6/36 y para el serotipo DEN-4 la cepa Dominica 4PC6/36 2PVERO 5PC6/36. Los sueros fueron tratados con cloroformo para su esterilización y después diluidos 1/30 en medio de mantenimiento. Las cepas virales se prepararon a una dilución que contenía 40 ufp/100 µL. Cada suero se mezcló con igual volumen de dilución de cada cepa viral. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 37 °C en ambiente de CO₂ a 5 %. Posteriormente 50 µL de cada una de las mezclas virus-suero y de los controles virales fueron inoculadas en 500 µL de suspensión de células BHK₂₁ clono 15 sembradas en placas de 24 pozos a una concentración de 2×10^5 células/mL. Se incubaron

durante 4 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 5 %. Después de este tiempo se añadió medio de recubrimiento a razón de 500 µL por pozo y las células fueron incubadas (7-9 d para DEN-1 y DEN-3, 5 d para DEN-2 y 6 d para DEN-4). Para cada suero, se calculó la media del número de placas y su porcentaje de reducción en relación con el virus control. Toda muestra con un porcentaje de reducción del número de placas mayor o igual que 50 % se consideró positiva.

RESULTADOS

Se confirmó el diagnóstico en 53 pacientes, el cual resultó 94,3 % (50/53) con FD y 5,7 % (3/53) con FHD. La infección en el sexo femenino fue más frecuente. Con respecto a la edad, 30 individuos eran menores de 20 años, 12 fluctuaron entre los 21 a 40 años y 11 resultaron mayores de 50 años. Entre las principales manifestaciones clínicas se observó fiebre, cefalea, dolor retroocular, dolores óseos y mialgias; siendo el signo prevaeciente la fiebre. Resulta importante señalar que en 62,3 % (33/53) de los casos se observaron manifestaciones hemorrágicas y que las más frecuentes fueron epistaxis, petequias y gingivorragia (tabla 1). Además de los síntomas antes mencionados, 3 de los pacientes presentaron signos de alerta como vómitos, dolor abdominal, hipotensión arterial y sudoración profusa, por lo que fueron hospitalizados, en donde evolucionaron a las formas graves de la enfermedad (FHD/SCD) y fallecieron 2, del sexo femenino, de 23 y 17 años de edad. En estos pacientes se confirmó por aislamiento viral que el agente etiológico fue el DEN-3.⁹ Se seleccionaron al azar 7 muestras que fueron procesadas para la determinación de anticuerpos neutralizantes (tabla 2); se encontró que solo 1 paciente (del sexo femenino) de 11 años de edad resultó con una infección primaria por el serotipo del DEN-3, esta paciente presentó un cuadro de FD con manifestaciones hemorrágicas (epistaxis, petequias y prueba del torniquete positiva). En los restantes pacientes se observó infección secundaria.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas más frecuentes de los casos estudiados

Manifestaciones clínicas	No.	%
Fiebre	53	100
Mialgias	53	100
Dolores óseos	51	96
Cefalea	50	94
Dolor retroocular	46	87
Epistaxis	33	62
Petequias	33	62
Gingivorragia	33	62
Vómitos	8	15
Dolor abdominal	3	6
Hipotensión arterial	3	6
Sudoración profusa	3	6

Tabla 2. Serotipos identificados en pacientes con fiebre por dengue

Paciente	Sexo	Edad	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
5	M	15	+	+	+	-
7	F	11	-	-	+	-
9	F	7	+	+	+	+
32	M	27	+	+	+	+
35	F	18	+	+	+	+
37	F	21	+	+	-	-
40	F	9	-	+	+	-

+: positivo, -: negativo.

DISCUSIÓN

Hasta 1997 no se habían detectado casos de dengue en las áreas rurales del Estado. En el mes de octubre, coincidiendo con la introducción del serotipo DEN-3, esta comunidad rural se vio afectada. Sin embargo, el hallazgo de casos secundarios en este brote, sugiere que ha habido circulación previa de los virus dengue en esta región y que no fueron detectados y notificados a la Secretaría de Salud.

En México durante 1997 el número de casos de FD aumentó como consecuencia de la entrada al país del serotipo DEN-3,¹⁰ posteriormente la introducción de un nuevo genotipo de virus DEN-3 fue asociado con el incremento de casos de FHD/SCD en países de Latinoamérica,¹¹ así como en Tailandia donde los casos de FHD por este serotipo prevalecieron en niños.¹²

La aparición de epistaxis o petequias es poco frecuente y varía con la edad, el sexo y las cepas del serotipo responsable, no obstante, en este brote 62,3 % de individuos presentó manifestaciones hemorrágicas. En Puerto Rico las

manifestaciones hemorrágicas se informaron en 24 a 38 % de los casos y 16 % en Brasil.^{13,14}

La amplia circulación del DEN-1 durante los años 70 y los 80 sensibilizó a un alto número de individuos para desarrollar una infección secundaria, que elevó el riesgo de FHD/SCD.¹⁵

Las formas graves de la enfermedad se producen principalmente en aquellas áreas en las cuales circulan en forma sucesiva o simultánea varios serotipos del virus, que se asocian a una infección de tipo secundaria por un segundo serotipo infectante;¹⁶ aun cuando la infección secundaria se ha relacionado fuertemente con el riesgo de padecer las formas severas de la enfermedad, está reportado que se observan casos severos entre 2 a 4 % en infecciones secundarias,¹⁷ similar a lo observado en este estudio donde fueron mínimos los casos de FHD, de tan solo 5,7 % (3/53).

El análisis epidemiológico de las epidemias de dengue revela que algunas cepas de este virus están asociadas a epidemias benignas y con la presencia de pocos casos de FHD/SCD, por lo que existe una ineficiente transmisión del virus, mientras que otras están involucradas en epidemias severas con una elevada incidencia de casos de FHD/SCD y una transmisión viral rápida.¹⁸ Se ha postulado, que las formas más severas de la enfermedad son causadas por la circulación de cepas con mayor virulencia.¹⁹

La primera epidemia de FHD en el continente tuvo lugar en Cuba en 1981, con solamente la circulación de 2 serotipos, lo que apoyaría la teoría de la hipótesis secuencial, sin embargo en otros países del continente americano como México, el comportamiento del dengue ha sido muy diferente, lo cual hace pensar que existen otros factores relacionados como la virulencia de la cepas, la etnia y genética de la población. Estudios recientes en México reportaron la asociación entre ciertos alelos clase I HLA y FHD; se encontró una alta frecuencia del alelo HLA-DRB1*04 en mexicanos que les proporciona una elevada resistencia, que podría explicar el desarrollo atípico de la FHD.²⁰

En este estudio se observó que un número importante de la población se infectó con el virus dengue durante el brote. El hallazgo de infecciones secundarias sugiere que ha habido circulación previa de los virus dengue, donde resultan

relevantes las manifestaciones hemorrágicas observadas en el cuadro clínico de 62,3 % de los casos, por lo que es conveniente realizar estudios de aislamiento y caracterización de las cepas de los virus dengue en esta región.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Máster en Ciencias Selene del Carmen Blum Domínguez, técnico del laboratorio de Virología, su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Clinical and laboratory characterization of a dengue outbreak in a rural area in Campeche, Mexico

ABSTRACT

BACKGROUND: the first dengue epidemics detected in a rural area of Campeche State in Mexico from October to December, 1977, which coincided with the occurrence of dengue serotype 3 in this state, was described. The population of the small affected community amounted to 214 inhabitants of Maya origin, with low socioeconomic standard. **OBJECTIVES:** to describe the characteristics of a dengue outbreak in a rural area, to find out the clinical forms and identify the serotypes in 10 dengue fever cases. **METHODS:** the clinical cases were classified according to PAHO/WHO guidelines. Capture MAC-ELISA test confirmed the dengue infection and the plaque reduction neutralization assay identified the primary or secondary infection. **RESULTS:** Out of 53 serologically-confirmed cases, 50 (94,3 %) evolved into dengue fever and 3 (5,7 %) into hemorrhagic dengue fever, two of which died. Hemorrhagic manifestations (epistaxis, petechias and gingivorhage) were observed in 62,3 % (33/53) of cases. Thirty individuals were under 20 years, 12 aged 21-40 years and 11 were over 50 years. Secondary infection was detected in 6 subjects and primary infection in one subject; this suggests that dengue virus had previously circulated in this region. **CONCLUSIONS:** for the first time, an outbreak was reported in a rural area of Campeche State in Mexico, which was related to the introduction of dengue serotype 3 in this region. The high number of dengue fever cases with hemorrhagic characteristics and the 3 hemorrhagic dengue fever cases suggested that this might have been a more aggressive viral strain, so it would be important to genetically characterize dengue viruses circulating in Campeche State.

Key words: Dengue, epidemics, rural area, serotypes, Mexico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schneider J, Droll D. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. June, 2001. Available in: http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue_timeline.xls
2. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G, *et al.* Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Pan Am J Public Health.* 1996;1:193-9.

3. Escobar MJ, Gómez DH. Determinantes de la transmisión del dengue en Veracruz: un abordaje ecológico para su control. *Salud Pública de México*. 2003;45:43-53.
4. Secretaría de Salud. Monografía del dengue, la fiebre hemorrágica del dengue y los mosquitos vectores; 1997. p.32.
5. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guías para la prevención y el control. Washington DC:OPS; 1995. (Publicación Científica 548).
6. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infection. *J Virol Meth*. 1991;33:101-13.
7. Morens MD, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells. Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol*. 1985;22(2):250-4.
8. Alvarez M, Rodriguez RR, Bernardo L, Morier L, Guzmán MG. Improved dengue virus plaque formation on BHK 21 and LLCMK₂ cells: evaluation of some factors. *Dengue Bull*. 2005;29:1-9.
9. Secretaría de Salud. Vigilancia Epidemiológica del Dengue. México, Dirección General de Epidemiología; 2000.
10. Briceño GB, Gómez DH, Argot RE, Montesano R, Vázquez MA, Ibáñez BS, *et al*. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in México. *Emerg Infect Dis*. 1996;2:133-5.
11. Figueroa R, Ramos C. Dengue virus serotype 3 circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res*. 2000;31:429-30.
12. Sukri N, Laras K, Wandra T, Larasati R, Rachdyatmaka J, Osok S. Transmission of Epidemic Dengue Hemorrhagic Fever In Easternmost Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(5):529-35.
13. Rigau-Pérez JC. Puerto Rico Association of Epidemiologists: Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. *Rev Panam Salud Pública*. 1997;1:381-88.
14. Zagne SMO, Alves VGF, Nogueira RMR. Dengue hemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: A study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88:667-79.
15. Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003;27:1-13.
16. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*. 1988;239:476-81.
17. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet*. 2002;2:33-42.
18. Teixeira MG, Barreto ML. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Intern Health*. 2002;7:757-62.
19. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*. 2000;74:74-7.
20. LaFleur C, Granados J, Vargas A, Ruiz M, Villareal G, Higuera L. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human Immunol*. 2002;63:1039-44.

Recibido: 29 de noviembre de 2006. Aprobado: 4 de abril de 2008.
 Lic. *Tayde Josefina Sosa Cabrera*. Departamento de Virología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Autónoma de Campeche, Calle 55 No. 31 Centro. Campeche, México. CP 24000. Teléf.: 981 81 6 40 03. Correo electrónico: taydesosa@hotmail.com