
Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el estado Aragua; Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998.

Darfa Elena Camacho, Maritza Álvarez, Francisco Rodríguez-Henríquez, Maritza de Quintana, Maritza Soler, Anna Chiarello, Gloria Sierra y Guillermo Comach.

Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua y CORPOSALUD Aragua, Maracay, Venezuela.

Palabras clave: Dengue, diagnóstico de laboratorio, vigilancia epidemiológica, MAC-ELISA, RT-PCR, inhibición de la hemaglutinación, aislamiento, identificación de virus dengue.

Resumen. La eficacia de un sistema de vigilancia epidemiológica proactivo para predecir epidemias de dengue depende de la capacidad del laboratorio para detectar tempranamente la circulación viral. Este estudio muestra los resultados de la vigilancia virológica y serológica del dengue, realizada en el estado Aragua (Venezuela) desde Octubre 1997 hasta Diciembre 1998. Se evaluaron 547 sueros de pacientes sospechosos de dengue mediante las técnicas de Aislamiento Viral y Serotipificación por Inmunofluorescencia (AVSI), Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR), Inmunoensayo Enzimático de Captura de IgM anti-dengue (MAC-ELISA) e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA). De los sueros examinados, 97,4% resultaron positivos a por lo menos una técnica; de estos, 60,4% fueron clasificados como casos confirmados (virologicamente positivos) y 39,6% como casos probables (virologicamente negativos, serologicamente positivos). Aunque la gran mayoría de los casos positivos ocurrieron en los períodos epidémicos de 1997 y 1998, el incremento paulatino de las tasas de seropositivos entre ambos períodos sugería la llegada de la epidemia de 1998. Se detectaron pacientes infectados con virus Den-1 (51,2%), Den-2 (37,9%), Den-4 (10,6%), y una infección mixta por Den-2 y Den-4 (0,3%). Se confirma la hiperendemicidad del dengue (co-circulación de Den-1, Den-2 y Den-4) en el estado Aragua, conjuntamente con la detección de pocos casos (6,5%) de Fiebre Hemorrágica de Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD); 38,1% de estos casos ocurrieron en pacientes con infecciones secundarias. El alto porcentaje (85,7%) de casos de FHD/SCD infectados con el virus Den-2 apoya la reportada virulencia de este serotipo.

Laboratory diagnosis of dengue virus infections in Aragua State, Venezuela: October 1997-December 1998.

Invest Clin 2003; 44(2): 91-103

Key words: Dengue, laboratory diagnosis, epidemiological surveillance, MAC-ELISA, RT-PCR, haemagglutination inhibition, isolation and identification of dengue virus.

Abstract. The efficacy of a proactive dengue surveillance system to predict epidemics depends on the laboratory diagnostic capacity for an early detection of virus circulation. This study shows the results of the dengue virologic and serologic surveillance accomplished in Aragua State (Venezuela) from October 1997 to December 1998. Five hundred and forty seven sera from suspected dengue patients were tested using the techniques of Virus Isolation and Immunofluorescence Serotyping (VIIS), Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Anti-dengue IgM Capture Enzyme Immunoassay (MAC-ELISA) and Haemagglutination Inhibition test (HI). Of the tested sera, 97.4% resulted positive to at least one technique; of these, 60.4% were classified as confirmed cases (virologically positives) and 39.6% as probable cases (virologically negatives/serologically positives). Though the majority of positive cases occurred during the 1997 and 1998 epidemic periods, the gradual increase of the seropositive rates between both periods suggested the incoming 1998 outbreak. Den-1 (51.2%), Den-2 (37.9%) and Den-4 (10.6%) infected patients were detected as well as one dual infection of Den-2 and Den-4 (0.3%). Dengue hyperendemicity (co-circulation of Den-1, Den-2 and Den-4) in Aragua State was confirmed together with the detection of few cases (6.5%) of Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome cases (HF/DSS); 38.1% of these cases occurred in patients with secondary infections. The high percentage (85,7%) of DHF/DSS cases infected by Den-2 virus supports the reported virulence of this serotype.

Recibido: 26-03-2001. Aceptado: 08-04-2003.

INTRODUCCIÓN

El dengue es considerado una enfermedad emergente y re-emergente debido al incremento en el número de casos, la expansión en áreas epidémicas y la aparición de formas clínicas severas como la Fiebre Hemorrágica de Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD), las cuales pueden ser fatales (1). Más de la mitad de la población mundial vive en áreas de riesgo de infección y se estima que anualmente ocurren en el mundo entre 50-100 millones de casos

de Fiebre del Dengue (FD) y 250.000 - 500.000 casos de FHD/SCD (2, 3). En el continente Americano, la emergencia de las epidemias de FHD/SCD ocurrió en 1981, casi 30 años después de su aparición en Asia y desde entonces se han reportado casos de FHD/SCD (4).

En Venezuela, desde su emergencia en 1989 (5) hasta 1998 (6), las tasas de morbilidad de la FHD/SCD han oscilado entre 3,8 (1992) y 27,8 (1997) por 100.000 habitantes, con una letalidad entre 0,6% (1998) y

2,8% (1992). El estado Aragua fue uno de los más afectados (7) y desde 1994 existe una hiperendemia debido a la circulación simultánea de por lo menos dos de los serotipos Den 1, Den 2 y Den 4 (8, 9).

La sostenida hiperendemia que existe en Venezuela, conjuntamente con el incremento paulatino de la morbilidad de la FHD/SCD, nos urge a implementar un sistema de vigilancia epidemiológica apoyado en un laboratorio que confirme los casos sospechosos de dengue, identifique los serotipos virales circulantes y realice un diagnóstico diferencial con otras enfermedades similares (2, 10-12). El objetivo fundamental de este sistema de vigilancia denominado proactivo (2, 11) es predecir los brotes epidémicos, lo cual se logra mediante un seguimiento continuo de la transmisión viral para detectar cualquier incremento significativo de la actividad viral mucho antes que ocurra el brote epidémico (2, 10, 11). Particularmente importante, es la detección de la actividad viral en los períodos interepidémicos y de transmisión silente cuando muchas infecciones no son reconocidas clínicamente. Estos períodos pueden ocurrir semanas o meses antes de que se inicie la transmisión, por lo que la capacidad predictiva del sistema de vigilancia proactiva dependerá de la eficacia del laboratorio para confirmar oportunamente las infecciones por virus dengue (VD) en los casos clínicos sospechosos de padecerla, utilizando para ello técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles (10, 11).

En este trabajo se presenta la confirmación de las infecciones por VD durante la fase aguda de la enfermedad (1-8 días de evolución) en pacientes sospechosos del estado Aragua, mediante las técnicas virológicas y serológicas disponibles en el laboratorio, como son: el Aislamiento Viral y Serotipificación por Inmunofluorescencia (AVSI) (13, 14), la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) (15), el inmunoensayo de captura de anti-

cuerpos IgM anti-dengue (MAC-ELISA) (16, 17) y la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) (18). Adicionalmente, se determinaron las formas clínicas que presentaron los casos confirmados, clasificadas de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (19), y las posibles asociaciones entre las formas clínicas del dengue y los serotipos de los virus infectantes.

PACIENTES Y MÉTODOS

Descripción del sistema de vigilancia epidemiológica proactivo del estado Aragua

El sistema de vigilancia epidemiológica proactivo para el control y la prevención del dengue en el estado Aragua constan de cuatro componentes operativos interconectados. El primer componente está constituido por los centros de salud centinelas (hospitales y ambulatorios urbanos y rurales de todo el estado), donde se atienden los casos clínicos sospechosos de dengue y se recolectan las muestras sanguíneas para enviarlas junto con sus fichas clínicas al segundo componente del sistema, el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV). El LARDIDEV se encarga de realizar las pruebas diagnósticas (viroológicas y serológicas) y enviar sus resultados a los dos restantes componentes del sistema: las Direcciones de Epidemiología y de Control de Fauna Nociva de CORPOSALUD-ARAGUA. La Dirección de Epidemiología se encarga de registrar y analizar los casos positivos a las pruebas de laboratorio, así como de remitirlos a la Dirección de Vigilancia Epidemiológica del MSDS. Finalmente, la Dirección de Control de Fauna Nociva se encarga de aplicar las medidas de control del vector (evaluación de criaderos, fumigación intradomiciliaria con insecticida órganofosforado, (Malathion al 94% ó Fenitrothion al 50%) y adición del larvicida órgano-

fosforado granulado Abate® (Temephos) al 1% a recipientes de agua artificiales), en las viviendas ubicadas en un perímetro de 200 mts alrededor del foco del caso confirmado o probable de dengue.

Muestras

Se evaluaron 547 sueros de pacientes sospechosos de padecer dengue (1 – 8 días de evolución de la enfermedad). Los pacientes fueron captados entre Octubre de 1997 y Diciembre de 1998, por el Programa Regional de Vigilancia Epidemiológica Proactiva del estado Aragua, y fueron analizados en el LARDIDEV. Durante el período de estudio ocurrieron en forma sucesiva la fase de descenso del período epidémico de 1997 (Octubre a Diciembre), el período inter-epidémico de 1998 (Enero a Mayo) y el período epidémico de 1998 (Junio a Diciembre). Cada muestra de suero estuvo acompañada de una ficha del paciente donde se reportaron datos personales (nombres, edad y sexo), clínicos (signos y síntomas) y epidemiológicos (vacunaciones contra rubéola, sarampión, fiebre amarilla y hepatitis, antecedentes personales o familiares de padecimiento de dengue, viajes recientes y ausentismo escolar o laboral debido al dengue).

Definición de casos de dengue según los resultados de laboratorio

Los pacientes que resultaron positivos a las técnicas de diagnóstico de laboratorio de dengue (viroológicas y/o serológicas) fueron clasificados según lo reportado por Rigau-Pérez y la Asociación de Epidemiólogos de Puerto Rico (20), con algunas modificaciones. Brevemente, se definen como casos confirmados de dengue, a los pacientes febriles que resultaron positivos a las técnicas virológicas utilizadas en este estudio (AVSI y/o RT-PCR), independientemente del resultado (positivo o negativo) obtenido con las técnicas serológicas (MAC-ELISA y/o

IHA $\geq 1/2560$), y casos probables de dengue, a los pacientes febriles que resultaron positivos a las técnicas serológicas, pero negativos a las virológicas.

Definición de casos clínicos de dengue

Se definieron como pacientes sospechosos de dengue todos aquellos que presentaron al momento de ser atendidos, fiebre acompañada de dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: dolor de cabeza, dolor retroocular, mialgia, artralgia, rash y manifestaciones hemorrágicas (21). La clasificación clínica de los casos de FD y FHD/SCD se realizó siguiendo los criterios recomendados por el comité de expertos de la OPS/OMS (19).

Extracción de ARN viral

Para la extracción del ARN viral se utilizó el kit RNAagents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 200 μ L de: a) sueros de pacientes sospechosos de dengue, b) sueros de personas sanas (controles negativos) y c) sobrenadantes de cultivos infectados con virus Den-1, Den-2, Den 3 y Den-4, identificados previamente con anticuerpos monoclonales específicos (14) (controles positivos de ARN viral). Las cepas de Den 1, Den 2 y Den 4 fueron aisladas de pacientes del estado Aragua; la cepa de Den-3 fue gentilmente donada por el Dr. Ferdinando Liprandi del Laboratorio de Biología de Virus del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Tipificación del VD por RT-PCR

La RT-PCR se realizó mediante el procedimiento descrito por Lanciotti y col. (15) utilizando el kit Access RT-PCR System (Promega Corporation, USA). Excepto por los cebadores, la utilización del kit Access RT-PCR requirió cambiar las condiciones experimentales (volumenes de reactivos, tiempos de reacciones y ciclajes) del

procedimiento original a las recomendadas por el fabricante. Los ADNc amplificados (amplicones) fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100V durante 60 min, seguido de coloración con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta (UV). La identificación del serotipo del VD se realizó de acuerdo a la talla en la distancia de migración relativa al marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega Corporation, USA).

Aislamiento viral y serotipificación específica con anticuerpos fluorescentes policlonales y monoclonales anti-dengue

Para el aislamiento viral los sueros de los pacientes (50 µL) fueron inoculados e incubados durante 5-6 días, a 33°C, en la línea celular C6/36 (clon HT) derivada de *Aedes albopictus* (13). Para la detección y serotipificación viral específica, con anticuerpos fluorescentes policlonales y monoclonales anti-dengue, se siguió el procedimiento descrito por Gubler y col. (14).

Ensayo inmunoenzimático de captura para IgM anti-dengue

La técnica MAC-ELISA se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kuno y col. (16), con ligeras modificaciones introducidas en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de la Habana, Cuba (17) y en el LARDIDEV (observaciones inéditas). Brevemente, las modificaciones introducidas fueron: 1) se utilizaron placas NUNC Maxisorp sensibilizadas con anti-IgM humana (Affinity Purified Antibody to Human IgM (µ) K & P Laboratories); 2) el bloqueo de las microplacas se realizó incubando con albúmina sérica bovina (ASB) al 4% por 30 minutos a 37°C; 3) los sueros (paciente y controles positivo y negativo) fueron diluïdos 1/20 en tampón fosfato salino pH 7,4 (TBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,14 g KH₂PO₄, 0,91g Na₂HPO₄ en 1000 mL agua destilada) con ASB al 0,5%; 4) se añadieron

50 µL por pozo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-flavivirus conjugado a peroxidasa (Peroxidase-conjugated IgG fraction monoclonal mouse antibody SLE Jackson Research) (16); 5) se utilizó como sustrato OPD (Orhophenylendiamine, 1 tableta de 2 mg, Sigma Chemical Co.) preparado en 5 mL de tampón fosfato-citrato con perborato de sodio (Phosphate-citrate buffer with sodium perborate, 1 cápsula para 100 mL de agua destilada; Sigma Chemical Co.), 6) se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 µL de ácido sulfúrico al 12,5% por pozo, y 7) se realizó la lectura a 492 nm. El valor de corte se estableció en dos veces la Densidad Optica (DO) del promedio de la lectura de los sueros controles negativos, por lo que un suero fue considerado como positivo cuando la DO era mayor que dicho valor de corte. Los casos positivos a la prueba MAC-ELISA (muestras séricas únicas) se definen como "probables" debido a que los pacientes pudieron haber padecido infección por el VD en los últimos tres meses (2, 3, 16, 20 - 23).

Inhibición de la Hemaglutinación

La determinación de los anticuerpos Inhibidores de la Hemaglutinación (IHA) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Clarke y Casals (18). En muestras únicas, se consideraron como positivos los sueros que presentaron títulos recíprocos de IHA $\geq 1:2560$ (23).

Métodos de análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa EpiInfo, versión 6.04b (Center for Diseases Control and Prevention, USA; World Health Organization, Switzerland), calculándose: razones de ventajas (Odds Ratio [OR]) con límites de confianza al 95% (LC95%), valores de Chi-cuadrado de Mantel-Haenszel y Yates y de probabilidad (*p*), a un nivel de confianza de 0,05 con 1 grado de libertad, y valores de Chi-cuadrado

derivados de la ecuación no corregida y los de probabilidad (*p*) a un nivel de confianza de 0,05, según el caso.

RESULTADOS

Se evaluaron 547 muestras de suero de pacientes sospechosos de dengue resultando 97,4% (533/547) positivas a por lo menos una de las pruebas virológicas y/o serológicas. De los sueros que resultaron positivos, 60,4% (322/533) se obtuvieron de casos que fueron clasificados como confirmados (virologicamente positivos, con o sin serología positiva) y 39,6% (211/533) de casos clasificados como probables (virologicamente negativos, con serología positiva).

La mayoría de los casos positivos se detectaron durante el período epidémico de 1998 (360/533, 67,5%: 40,3% confirmados y 27,2% probables) y en la fase de descenso del período epidémico de 1997 (97/533, 18,2%: 11,8% confirmados y 6,4% probables) (Fig.1). Por otra parte, durante el corto período inter-epidémico de 1998 se detectaron 14,3% de casos positivos (76/533) con una proporción de casos confirmados y probables bastante similares (8,3% y 6,0%, respectivamente). Es de resaltar, sin embar-

go, que en el transcurso de este período inter-epidémico, los porcentajes mensuales de casos positivos aumentaron continuamente de 2,8% en febrero a 4,7% en mayo (Fig. 1).

De los casos confirmados, 69,3% (223/322) fueron detectados únicamente por RT-PCR, y 30,8 % (99/322) por AVSI y RT-PCR. Las frecuencias relativas de los serotipos de VD identificados por RT-PCR y/o AVSI fueron 51,2% (165/322) Den-1; 37,9% (122/322) Den-2, y 10,6% (34/322) Den-4; adicionalmente, se detectó una infección mixta (0,3%) Den-2 y Den-4.

De los casos confirmados, 21,7% (70/322) presentaron respuestas de anticuerpos anti-dengue de tipo IgM, 13,7% (44/322) de tipo IHA; y 17,1% (55/322) de ambos tipos, IgM e IHA. De los casos probables, 30,8% (65/211) mostraron respuestas de anticuerpos anti-dengue de tipo IgM, 22,8% (48/211) de tipo IHA y 46,5% (98/211) de ambos tipos, IgM e IHA. Siguiendo los criterios de la OMS/OPS (19), todos los casos que evidenciaron respuestas de anticuerpos anti-dengue de tipo IHA (títulos $\geq 1/2560$) (99 confirmados + 146 probables / 533 = 46%), fueron considerados como casos de infección secundaria.

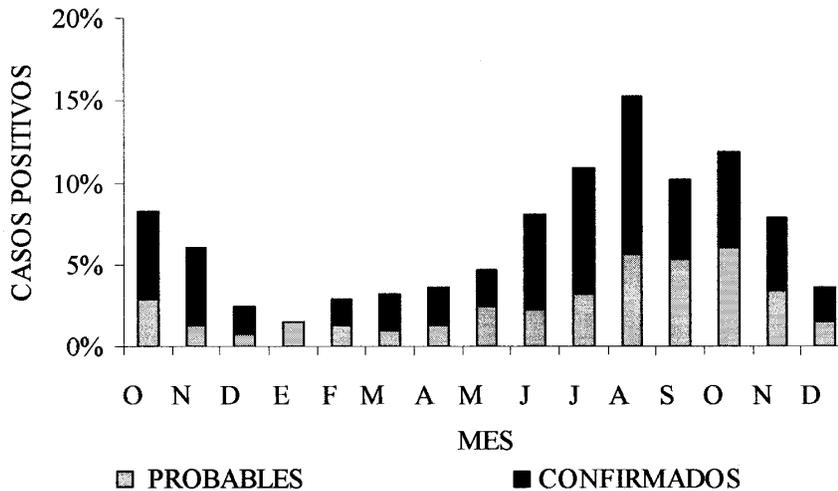


Fig. 1. Casos con diagnóstico de laboratorio positivo de dengue detectados en el estado Aragua entre: Octubre 1997 y Diciembre 1998.

En la Tabla I puede observarse que las tasas de positividad para anticuerpos IgM y los títulos de anticuerpos IHA en los sueros que resultaron negativos al AVSI, individualmente (grupo II: RT-PCR+/AVSI-) o en combinación con la RT-PCR (grupo III: RT-PCR-/AVSI-), fueron significativamente mayores que en los sueros que resultaron positivos a ambas técnicas (grupo I: RT-PCR+/AVSI+). Los resultados también muestran que 71 de los 96 sueros que resultaron positivos al RT-PCR no pudieron ser detectados mediante el AVSI.

Se determinó que 93,5% (301/322) de los casos confirmados sufrieron FD, mientras que 6,5% (21 de 322) padecieron

FDH/SCD (Tabla II). Clasificando de acuerdo al grado de severidad de la FHD/SCD, se determinó que 9,5% (2/21) de los pacientes correspondieron al grado I, 57,1% (12/21) al grado II, 23,8% (5/21) al grado III, y 9,5% (2/21) al grado IV.

Se determinaron las frecuencias relativas de las formas clínicas del dengue que presentaron los casos confirmados que sufrieron infecciones secundarias, encontrándose que la mayoría (91/99, 91,9%) correspondieron a casos clínicos de FD. Por otro lado, se determinó que el porcentaje de infecciones secundarias en los individuos que sufrieron FHD (8/21, 38,1%) fue mayor que en los que padecieron FD (91/301, 30,2%).

TABLA I
TASAS DE POSITIVIDAD DE LAS TÉCNICAS VIROLÓGICAS EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-DENGUE EN MUESTRAS DE SUERO COLECTADAS EN LOS CINCO PRIMEROS DÍAS DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Anticuerpos Anti-Dengue		Sueros de Pacientes (n = 453)		
		Grupo I* (n = 94)	Grupo II** (n = 189)	Grupo III*** (n = 170)
IgM	Positivos	25 (26,6%)	71 (37,6%)	129 (75,9%) ^a
	Negativos	69 (73,4%)	118 (62,4%)	41 (24,1%)
Títulos IHA	≥1/1280	17 (18,1%)	81 (42,9%) ^b	114 (67,1%) ^{c,d}
	1/20-1/640	58 (61,7%)	89 (47,1%)	41 (24,1%)
	<1/20	19 (20,2%)	19 (10,1%)	15 (8,8%)

*Grupo I: RT-PCR y AVSI positivos. **Grupo II: RT-PCR positivos y AVSI negativos. ***Grupo III: RT-PCR y AVSI negativos. ^a $\chi^2 = 53,25$ vs Grupo I y $\chi^2 = 60,50$ vs Grupo II. ^b $\chi^2 = 17,02$. ^c $\chi^2 = 58,07$ vs Grupo II. ^d $\chi^2 = 21,13$ vs Grupo I; $p < 0,001$.

TABLA II
DIAGNÓSTICO CLÍNICO E IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE VIRUS DENGUE (VD) EN 322 CASOS CONFIRMADOS POR LAS TÉCNICAS DE AVSI Y RT-PCR

Diagnóstico Clínico*	Serotipos de VD								Total	
	DEN 1		DEN 2		DEN 4		DEN 2 & DEN 4			
FD [†]	162	(53,8%)	104	(34,6%)	34	(11,3%)	1	(0,3%)	301	(93,5%)
FHD/SCD [‡]	3	(14,3%)	18	(85,7%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)	21	(6,5%)
Total	165	(51,2%)	122	(37,9%)	34	(10,6%)	1	(0,3%)	322	(100,0)%

*El diagnóstico clínico de los pacientes fue realizado de acuerdo a los criterios de definición de casos de la OMS (19). [†]Fiebre de Dengue. [‡]Fiebre Hemorrágica de Dengue/Síndrome de Choque por Dengue.

Se determinaron las asociaciones estadísticas (OR) entre los serotipos virales infectantes y la severidad de los cuadros clínicos en los casos confirmados. El riesgo de padecer la forma no severa de la enfermedad (FD) estuvo significativamente asociado a las infecciones con el serotipo Den-1 (OR = 7,4; LC95% = 1,89 – 31,09; χ^2 de Mantel-Haenszel = 12,35; valor p = 0,0004), y con el serotipo Den-4 (todos los casos de FD). Por otra parte, el riesgo de padecer las formas severas de la enfermedad (FHD) estuvo significativamente asociado a las infecciones con el serotipo Den-2 (OR = 11,20; LC95% = 2,99 – 49,55; χ^2 de Mantel-Haenszel = 21,42; valor p = 0,000003), mientras que en los pacientes infectados con Den-1 la asociación fue significativamente inversa (OR = 0,14; LC95% = 0,03 – 0,53; χ^2 de Mantel-Haenszel = 12,35; valor p = 0,0004).

DISCUSIÓN

En Aragua, como en toda Venezuela y muchos países donde el dengue es endémico, los programas de prevención y control dependían fundamentalmente de sistemas de vigilancia epidemiológica clínica o pasiva para monitorear la actividad de la enfermedad, detectar cualquier aumento de la incidencia, definir las tendencias de transmisión y evaluar la magnitud de las epidemias. Sin embargo, el sistema de vigilancia pasiva es de muy baja sensibilidad en los períodos interepidémicos, donde la transmisión del dengue es baja, ya que no son diagnosticados correctamente todos los casos de la enfermedad (2, 3, 10-12, 21). Por esta baja sensibilidad, para el momento en que los casos de dengue son detectados y notificados, ya ha ocurrido una considerable transmisión por lo que resulta tardío lograr una reducción significativa de esta transmisión a través de medidas de control (2, 10-12).

A partir de 1996, se inició en Aragua el Programa Regional de Vigilancia Epidemiológica Proactivo para el Control y la Prevención del Dengue a través de establecimientos centinelas (24). Desde Enero de 1996 hasta Septiembre de 1997, el programa de Aragua escrutaba los casos mediante pruebas de laboratorio serológicas, generando, por primera vez en el estado, registros de casos de dengue más confiables que los obtenidos mediante la notificación pasiva (7, 25). Desde Octubre de 1997, se introduce el diagnóstico virológico (AVSI y RT-PCR) para determinar la presencia, distribución geográfica y dinámica de transmisión de los serotipos virales circulantes, completándose de esta manera las herramientas de laboratorio necesarias para realizar una vigilancia proactiva más precisa.

Según los datos del presente estudio, la implementación del sistema de vigilancia proactiva del dengue en el estado Aragua, entre Octubre de 1997 y Diciembre de 1998, permitió determinar que 97,4% de los pacientes sospechosos resultaron positivos a por lo menos una de las técnicas de diagnóstico virológicas y/o serológicas; de estos 60,4% padecían infecciones activas (casos confirmados) y 39,6% infecciones recientes (casos probables) que ocurrieron en el transcurso de los tres últimos meses (2, 3, 16, 20-23).

De acuerdo a los hallazgos de este estudio, las tasas de positividad son mayores que las reportadas por otros laboratorios de vigilancia proactiva como los del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) y del Center for Disease Control and Prevention (CDC) de San Juan, Puerto Rico (26, 27). En 1998, 63,4% (2.354 de 3.715) y 7,7% (66 de 847) de los sueros analizados en el INHRR resultaron positivos al diagnóstico serológico y virológico; respectivamente (26). En Puerto Rico, entre Enero y Agosto de 1998, se diagnosticaron como positivos-serológicos y/o virológicos-

42,7% (4.190 de 9.803) de los casos notificados, y 12,1% (564 de 4.190) correspondieron a casos confirmados (27). Las mayores tasas de positividad reportadas en nuestro estudio muy probablemente están asociadas a las altas incidencias de casos ocurridos en Aragua durante las epidemias de 1997 y 1998. Las altas tasas de casos positivos detectadas durante la fase de descenso de la epidemia de 1997 (18,2%) y la epidemia del 1998 (67,5%) corroboran lo argumentado anteriormente. Por otra parte, el alto porcentaje de casos totales (97,4%) detectados sugiere que el sistema de vigilancia epidemiológica proactivo implementado en nuestro estado es altamente específico para la detección de casos evidentes de dengue, pero poco sensible para la detección de formas leves o febriles indiferenciadas (Russell K, 1999, comunicación personal). La eficacia del sistema de vigilancia epidemiológica de Aragua para detectar casos evidentes de dengue, sugiere que la sensibilidad y especificidad del mismo depende no solamente del esfuerzo ejercido en la identificación de los casos, si no también, de la consistencia, y severidad de los síntomas de la enfermedad (11).

Uno de los atributos de la vigilancia proactiva que ha sido ampliamente reportado es su capacidad predictiva. En Puerto Rico, por ejemplo, el sistema de vigilancia proactivo detectó la introducción de los serotipos Den-1 y Den-2 en 1984, y esa información fue utilizada para predecir un pequeño brote epidémico en 1985 (10). También fueron capaces de predecir otras epidemias mayores en 1986 y 1987 con varios meses de anticipación. El carácter retrospectivo de los datos recolectados en nuestro estudio, imposibilitó el análisis de tendencia que permitiera predecir con exactitud el momento de aparición de la epidemia de 1998. Sin embargo, el incremento sostenido de los porcentajes de casos positivos a las pruebas diagnósticas del

dengue durante el período inter-epidémico sugería la proximidad de dicha epidemia.

En las infecciones humanas por VD, la viremia es detectable durante los 5 primeros días del inicio de la enfermedad (DIE) (rango: 2 - 12 días, dependiendo de la cepa viral y el estado de inmunidad del individuo) y luego desaparece rápidamente con la aparición de los anticuerpos específicos (3, 22). En este sentido, los resultados de la Tabla I sugieren una posible asociación entre la circulación de anticuerpos IgM y IHA (títulos $\geq 1/1280$) y la disminución de la viremia en los primeros cinco días de la enfermedad, expresada en una reducción de la eficacia de las técnicas virológicas (AVSI y RT-PCR) para detectar viriones viables (y probablemente ARN) de VD en los sueros de los pacientes con niveles detectables de dichos anticuerpos. Se ha propuesto que la formación de complejos virus-anticuerpos neutralizantes disminuye la infectividad de los viriones para los cultivos celulares (3, 22, 28-30). En concordancia con este argumento, el hallazgo de tasas significativamente mayores de detección de anticuerpos IgM y/o IHA en las muestras que resultaron negativas al AVSI, sugieren que en efecto dichos anticuerpos neutralizan *in vivo* los VD, disminuyendo el número de viriones viables disponibles para infectar *in vitro* los cultivos celulares. Los resultados también sugieren que cuando los sueros contienen anticuerpos IgM anti-dengue, la eficacia para detectar el VD del AVSI es mucho menor que la de la RT-PCR. Obsérvese que cuando los sueros contienen IgM la detección del VD mediante la RT-PCR es 2,8 veces mayor que con el AVSI, lo cual concuerda con lo reportado por Vorndam y Kuno (22). La desproporción entre el número pequeño de viriones viables y el número mucho mayor de células C6/36 del cultivo *in vitro* (14), podría explicar la reducción significativa de la eficacia de la técnica del AVSI para detectar

el VD en pacientes con respuestas humorales (IgM y/o IHA) tempranas.

Desde el año 1963 hasta la década de los 80, los países de Latinoamérica se caracterizaron por presentar patrones de transmisión del VD no endémicos o hipo-endémicos (un sólo serotipo presente) (31). Sin embargo, en los años 70-80 América Central y del Sur padecieron la re-invasión del *Aedes aegypti*, principal vector de la enfermedad; y de forma simultánea se incrementó el movimiento de la población y, por ende, la subsecuente propagación del virus; la combinación de estos dos eventos resultó en la circulación simultánea de múltiples serotipos del virus (1, 3, 31). La detección de 322 infecciones por VD y la circulación simultánea de tres serotipos - Den-1, Den-2 y Den-4 en Aragua, entre Octubre de 1997 y Diciembre de 1998, constituyen evidencias inequívocas de una situación de hiperendemicidad francamente establecida. Revisando la situación retrospectivamente, encontramos que entre 1991 y 1996 ocurrió la circulación de dos o más serotipos en una o más entidades federales de Venezuela y en Aragua entre 1994 y 1996 (8). Todo lo anterior permite deducir que la hiperendemicidad del VD en Aragua y otros estados de Venezuela, se ha desarrollado progresivamente desde 1989, incrementado su intensidad particularmente a partir de 1996.

Se ha reportado insistentemente que la hiperendemia del dengue constituye un factor de riesgo determinante para la aparición de epidemias de FHD/SCD en el Suroeste Asiático y el continente Americano, y que dichas epidemias son el resultado de el incremento de casos de infecciones secundarias (1-4, 12, 32-34). Por otra parte, Rosen (35, 36) sostiene que ciertos serotipos, o aislados (genotipo, subtipo, biotipo o topotipo) de VD constituyen un posible factor de riesgo para la aparición de las formas severas FHD/SCD. Algunos investigadores (37) sostienen que el pasaje *in vivo* del vi-

rus (transmisión *in vivo*) en hospedadores vertebrados (hombre) e invertebrados (mosquito), puede modificar la virulencia de algunos serotipos circulantes. La modificación de la virulencia de un serotipo determinado podría ser la consecuencia de cambios moleculares. Así por ejemplo, en el caso del serotipo Den 2, genotipo III (asiático), se ha determinado que existen diferencias moleculares posiblemente correlacionadas con la patogenicidad o virulencia de este genotipo (37-39). Las diferencias están localizadas en las proteínas de la envoltura (E) (37), de premembrana (prM) (37, 38), de algunas no estructurales NS1 (37, 39), NS2a (39), NS4b (38) y NS5 (38, 39), y de los genes que codifican estas proteínas y de la región 5' y 3' no traducible. Otra evidencia que refuerza la propuesta de Rosen (35, 36) es que la mayoría de las epidemias de FHD/SCD que han ocurrido en las islas del Caribe, Centro y Sur América han sido ocasionados por el serotipo Den 2 (4, 5, 7, 12, 30), y para algunos investigadores del genotipo asiático (9, 40, 41).

Los hallazgos del presente estudio proveen evidencias que apoyan ambas propuestas. La evidencia que apoya la propuesta de la hiperendemicidad como factor de riesgo para la aparición de casos de FHD (1-4, 12, 32-34), es la coincidencia de la co-circulación de tres serotipos (Den-1, Den-2 y Den-4) con la detección de mayores tasas de infecciones secundarias en los casos de FHD que en los de FD (38,1% vs 30,2%). Por otro lado, en apoyo a la propuesta de la mayor virulencia de determinados aislados virales (35, 36), están el alto porcentaje de infecciones por el serotipo Den-2 detectadas en los casos de FHD/SCD (87,5% de todos los casos; 100% de los casos más severos, grado III y IV), y el riesgo significativo que presentaron los pacientes infectados con virus Den-2 de padecer FHD/SCD.

Este estudio refleja la situación de hiperendemicidad que presenta el estado Ara-

gua y el país desde 1989, concomitante con la continua aparición de casos de FHD/SCD, probablemente resultantes del incremento de las infecciones secundarias. Así mismo, los datos proveen evidencias de la circulación de virus serotipo Den-2 asociado a los casos severos (FHD/SCD) de la enfermedad. Todo lo anterior enfatiza la necesidad e importancia de mantener y fortalecer el programa regional de vigilancia epidemiológica proactiva que desde el año 1996 se ha venido ejecutando en el estado.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal de CORPOSALUD-ARAGUA por la captación de pacientes sospechosos de dengue, el registro de datos clínicos y la toma de las muestras sanguíneas de dichos pacientes y envío de las muestras al LARDIDEV; a la Fundación para la Ciencia y la Tecnología del Estado Aragua (FUNDACITE ARAGUA), CORPOSALUD ARAGUA, la Dirección General de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria del M.S.D.S. y la Universidad de Carabobo, por crear y sostener al LARDIDEV; al Center for Diseases Control and Prevention, de Fort Collins, Colorado, y de San Juan, Puerto Rico, por su desinteresada asesoría y provisión constante de anticuerpos monoclonales anti-dengue, antígenos de VD, sueros de referencia, células C6/36-HT y Vero; al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", por proveernos de Kits diagnóstico MAC-ELISA para dengue; a la Sección de Arbovirus del Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV-CENIAP.-FONAIAP), por proveernos de reactivos para la IHA; al Dr Robert Shope, de la Universidad de Texas, Galveston, Texas, EUA, por proveernos de antígenos de VD.

Investigación financiada por los proyectos PCEE Ven/96/002- LP2129, PCEE CONV-1-97, CDCH-UC 1374-97 y FUNDACITE ARAGUA DLSA-0048.

REFERENCIAS

1. **Gubler DJ, Clark GG.** Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995; 1:55-57.
2. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3):480-496.
3. **Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders E, Vorndam AV.** Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 352: 971-977.
4. **Pinheiro F, Corber S.** Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *Wld Hlth Statist Quart* 1997; 50:161-169.
5. **Anonimous.** Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull PAHO* 1990; 11:7-9.
6. **Mazzarri MB, Mora JD, Godoy O, Guevara de Sequeda M.** Situación del dengue y el programa de control de *Aedes aegypti* en Venezuela. 1998. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. 1998; XXXVIII (2): 137-144.
7. **El dengue en Venezuela. 3.- Aragua: un estado afectado por el dengue.** En: Larrea F, Salas H, Montiel L, Godoy O, Bañuelos A, Prieto de Abreu M, Villalobos de Chacon I, Romero Trejo I, Castillo Alcalde I, Eds. *Temas de Epidemiología: El dengue y el Sarampión en Venezuela.* Caracas: MSAS/OMS/OPS; 1997. p 17-18.
8. **El dengue en Venezuela. 2.- Venezuela: el segundo brote más importante.** En: Larrea F, Salas H, Montiel L, Godoy O, Bañuelos A, Prieto de Abreu M, Villalobos de Chacon I, Romero Trejo I, Castillo Alcalde I, Eds. *Temas de Epidemiología: El dengue y el Sarampión en Venezuela.* Caracas: MSAS/OMS/OPS; 1997. p 12-16.
9. **Salas RA, Tovar D, Barreto A, de Miller E, Leitmeyer K, Rico-Hesse R.** Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990 – 1997. *Acta Cient Venez* 1998; 49(Sup. 1):33-37.
10. **Gubler DJ.** Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bull Pan Am Health Organ* 1989; 23(4):397-404.

11. **Rigau-Perez, JG, Gubler, DJ.** Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. En: Gubler DJ, Kuno G. Eds. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Wallingford: CAB International; 1997. p 405-423.
12. **WHO.** Disease surveillance and outbreak prevention and control. En: Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 1997. p 60-66.
13. **Igarashi A.** Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. J Gen Virol 1978; 40:531-544.
14. **Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A.** Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 1984; 33(1):158-165.
15. **Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 545-551.
16. **Kuno G, Gomez I, Gubler DJ.** Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(1):153-159.
17. **Instituto "Pedro Kourí".** Elisa de captura de IgM en: Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de dengue. La Habana: IPK; 1995. p. 53 - 55.
18. **Clarke DH, Casals J.** Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. Am J Trop Med Hyg 1958; 7:561-573.
19. **WHO.** Clinical diagnosis. En: Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 1997. p 12 - 23.
20. **Rigau-Perez JG.** The Puerto Rico Association of Epidemiologists. The clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico. Pan Am J Public Health 1997; 1:381-388.
21. **Dietz VJ, Gubler DJ, Rigau-Perez JG, Pinheiro F, Schatzmayr HG, Bailey R, Gunn RA.** Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. Am J Epidemiol 1990; 131(4):693-701.
22. **Vorndam V, Kuno G.** Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler DJ, Kuno G. Eds. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Wallingford: CAB International; 1997. p 313-334.
23. **WHO.** Laboratory diagnosis. En: Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 1997. p 34 - 47.
24. **Comach G.** Propuesta para un Programa de Vigilancia Epidemiológica y Control del Dengue a través de Establecimientos Centinelas en el Estado Aragua Memorias de la Jornada sobre Evolución, Diagnóstico y Control del Dengue. Maracay: FUNDACITE ARAGUA/CORPOSALUD ARAGUA; 1996. p 1-5.
25. **Cáceres JL.** Epidemiología del dengue en el Estado Aragua 1996. Gobernación del Estado Aragua, Corporación de Salud del Estado Aragua (CORPOSALUD), Dirección de Saneamiento Ambiental, Servicio de Endemias Rurales; 1997. p 1-56.
26. **MSAS.** Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Boletín Epidemiológico. Resumen Enero - Diciembre. Caracas: INHRR, MSAS; 1998. p 2.
27. **Feliciano de Melecio C, Horta H, Barea R, Casta-Velez A, Ayala A, Vargas-Nunez C, Deseda C, Hunter-Mellado R, Morales-Morales J, Figueroa I, Reyes O, Munoz B, Mercado MA, Davila L, German E, Puerto Rico Association of Epidemiologists.** Dengue Br and Arbovirus Diseases Br CDC. Dengue outbreak associated with multiple serotypes-Puerto Rico, 1998. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1998 Nov 13; 47(44): 952-956.
28. **Chan SY, Kautner IM, Lam SK.** The influence of antibody levels in dengue diagnosis by polymerase chain reaction. J Virol Methods. 1994; 49(3): 315-322.
29. **Chang G-JJ, Trent DW, Vorndam V, Vergne E, Kinney RM, Mitchell CJ.** An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-

- enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize Flaviviruses. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2):477-483.
30. **Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E.** Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6):893-897.
 31. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. En: Gubler DJ, Kuno G. Eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, Wallingford: CAB International; 1997. p 1-22.
 32. **Halstead SB.** Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988; 239:476-481.
 33. **Halstead S.** Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21:(4):636-641
 34. **Halstead S.** The XXth century pandemic: need for surveillance and research. *Rapp Trimestr Statisc Sanit Mond* 1992; 45:292-298.
 35. **Rosen L.** The Emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1977; 26:337-343.
 36. **Rosen L.** The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *Jpn J Trop Med Hyg.* 1986; 14: 117-122.
 37. **Thant KZ, Morita K, Igarashi A.** Detection of the disease severity-related molecular differences among new Thai dengue-2 isolates in 1993, based on their structural proteins and major non-structural protein NS1 sequences. *Microbiol Immunol.* 1996; 40(3):205-216.
 38. **Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos-Chacon I, Ramos C, Rico-Hesse R.** Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999; 73(6): 4738-4747.
 39. **Mangada MN, Igarashi A.** Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology.* 1998; 244(2): 458-466.
 40. **Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, Kouri G.** Partial nucleotide and aminoacid 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; 52:241-246.
 41. **Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT.** Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230(2): 244-251.