

Notas Científicas

Tipos del virus dengue identificados en pacientes del Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela

Dengue virus types identified in patients attended at Medical Center Dr. Rafael Guerra Méndez, Valencia, Carabobo, Venezuela

Sandra Abou Orm¹, Angélica Jiménez¹, Marifel Carrozza¹, Haydee Ochoa² & Flor Herrera^{1*}

RESUMEN

En esta investigación se llevó a cabo un estudio descriptivo de 114 muestras serológicas de pacientes con sospecha clínica de dengue, según criterios establecidos por la Organización Mundial para la Salud (OMS), que se recibieron durante el mes de junio de 2010 en el Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez, de la ciudad de Valencia, Estado Carabobo. Las muestras se trasladaron al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC) y se analizaron por la técnica de RT-PCR anidada. Los resultados indicaron positividad en 46 muestras y la presencia de los 4 tipos del virus dengue. Los tipos detectados con mayor frecuencia fueron DEN-4 (34,8%), seguido por el DEN-3 (32,6%), sobre todo en niños ≤ 12 años que representaron el 54% del total de las muestras.

Palabras clave: Dengue, tipos, RT-PCR.

El dengue es una enfermedad infecciosa (asintomática o de intensidad variable: fiebre dengue (FD), dengue hemorrágico (DH) o síndrome de choque por dengue (SCD) causada por un virus, transmitida por mosquitos del género *Aedes* y en las últimas décadas ha pasado a ser un problema de salud pública mundial (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>, Consultado: Enero,

SUMMARY

This research conducted a descriptive study of 114 serum samples from patients with clinical suspicion of dengue, according to criteria established by the World Health Organization (WHO) who were received during the month of June 2010 at the Medical Center Dr. Rafael Guerra Mendez in the city of Valencia, Carabobo State. Samples were transported to the Institute of Biomedical Research of the University of Carabobo (BIOMED-UC) and analyzed by RT-nested PCR. The results showed positivity in 46 samples and the presence of the 4 types of dengue virus. The most frequently detected types were DEN-4 (34.8%), followed by DEN-3 (32.6%) which were, especially in children ≤ 12 years and accounted for 54% of total samples.

Key words: Dengue, types, RT-PCR.

22, 2012). En la Región de las Américas, la situación epidemiológica cambió dramáticamente a mediados del siglo pasado ya que en veinte años, la Región pasó de tener una baja endemicidad a una situación de hiperendemia con la circulación simultánea de varios tipos, epidemias frecuentes, muchos países endémicos, con numerosos casos y epidemias de DH (Guzmán *et al.*, 2006, *Rev. Panam. Salud Publica*, **19**:

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

²Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez, Valencia, Carabobo, Venezuela.

*Autor de correspondencia: juan.navarro@ciens.ucv.ve

204-215; Kouri, 2006, *Rev. Panam. Salud Publica*, **19**: 143-145). Estos autores también mencionan que ha aumentado el número de países que notifican casos de DH y la incidencia mantiene una tendencia ascendente.

Los 4 tipos del VDEN (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) circulan en nuestro país, por lo cual la enfermedad se considera hiperendémica (Barrera *et al.*, 2002, *Pan. Am. J. Public Health*, **26**: 84-95). Esta situación plantea la necesidad de identificar los patrones de distribución de los tipos y su asociación con la presencia de casos de FD, incluyendo los graves; de tal manera de apoyar al sistema de vigilancia epidemiológico de una región en particular. En este sentido, se ha reportado que los casos de dengue grave son más frecuentes en personas que ya padecieron dengue por un tipo (infección primaria) y se infectan nuevamente (infección secundaria) con un tipo diferente al que le ocasionó el primer cuadro (Halstead 2009, *Annals NYAS*, 1171: E48-E56. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05052.x).

Un estudio longitudinal (>27 años) realizado en Tailandia sugiere que la relación entre los tipos de virus dengue circulantes y la severidad de la enfermedad no es un evento al azar ya que pudieron aislar con mayor frecuencia, tipos de dengue específicos para distintos estados de la enfermedad (Nisalak *et al.*, 2003, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**:191-202). Estos autores también sugieren que las características de la población en cuanto a susceptibilidad e inmunidad son importantes para la emergencia de nuevos tipos y la producción de epidemias.

La confirmación de los casos clínicos de dengue se puede realizar utilizando técnicas que permitan identificar: a) de forma directa al virus en el suero, como el cultivo viral, la detección del material genómico del virus por la técnica de transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o mediante la detección de antígenos virales por medio de la técnica ELISA o técnicas rápidas dirigidas sobre todo al antígeno de la envoltura y membrana y la proteína 1 no estructural -NS1- (Kao *et al.*, 2005, *J Microbiol Immunol Infect*, **38**:5-16; Shu PY *et al.*, 2003 *Clin Diagn Lab Immunol*, **10**: 622-630) y b) por métodos indirectos constituidos, principalmente, por técnicas serológicas para detectar anticuerpos específicos contra este virus.

El más relevante es el ensayo inmunoenzimático ELISA de captura en fase sólida que permite la detección de anticuerpos IgM (infección primaria) e IgG (infección secundaria) anti-dengue (Acosta & Gomez, 2005, *Rev Biomed*, **16**: 113-137).

Aunque el cultivo viral facilita el aislamiento de cepas virales y sus distintos genotipos, (estos últimos detectados mediante la secuenciación de regiones genómicas que facilita la identificación de diferencias puntuales imposible de conocer serológicamente), exige condiciones especiales de laboratorio y un tiempo considerable mientras que la RT-PCR ha facilitado el desarrollo de una prueba muy sensible, específica y rápida, importante para la investigación clínica y epidemiológica del dengue. Sin embargo, hay que reconocer que el RT-PCR es costosa y necesita una infraestructura adecuada la cual no está presente en la mayoría de los laboratorios de vigilancia epidemiológica.

Este trabajo persigue la confirmación de la infección por virus dengue y la identificación de los tipos en pacientes febriles que acudieron al Centro Médico Dr. Rafael Guerra Méndez, de la ciudad de Valencia, Estado Carabobo, Venezuela, utilizando la técnica de RT-PCR, durante el mes de junio de 2010, periodo en el cual se presentó un número considerable de casos en el Centro Médico. Para ello, a todos los pacientes con sospecha de dengue, en base a los criterios clínicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (fiebre, astralgia, cefalea, mialgia, entre otros) (WHO, 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd Ed., Geneva; p 12-23) se les tomó muestra de sangre completa durante los primeros 5 días del inicio de la etapa febril, obteniendo, posteriormente, el suero correspondiente (centrifugación a 5000 rpm, por 10 min) los cuales se mantuvieron y enviaron refrigerados (a 4°C) al BIOMED-UC para el diagnóstico molecular de dengue. Para ello se extrajo el ácido ribonucleico (RNA) mediante la técnica de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico modificado (Urdaneta *et al.*, 2005, *Infect Genet. Evol.*, **5**: 177-184) y con el RNA resultante se procedió a realizar la RT-PCR para sintetizar el ADN complementario y luego un segundo PCR para identificar al tipo del virus (Lanciotti *et al.*, 1992, *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 545-551). Los ADN amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml, durante 10

min), permitiendo visualizar las bandas de ADN amplificadas en un equipo de fotodocumentación mediante el programa MultiAnalyst BIORAD versión 1.1 (1996-97). Se procesaron 114 muestras de pacientes, utilizando RT-PCR, de las cuales 46 fueron positivas para dengue y se observó la presencia de los cuatro tipos en diferentes sueros individuales y no se observaron infecciones mixtas. (Fig. 1). La distribución de los casos de dengue se presenta en la Tabla I. Las infecciones más frecuentes fueron ocasionadas por DEN-4, seguida por el DEN-3 y sobre todo (54%) en niños ≤ 12 años (Fig. 2), lo que significa que la población infantil y de adultos jóvenes son las más susceptibles a esta virosis. Esto

Fig. 1. Productos de RT-PCR anidada para virus dengue. Gel de agarosa al 2%. Línea M: marcador de tamaño molecular (100 pb-3000 pb) (Axygen). Línea 1: control negativo de reacción. Líneas 2 y 6: pacientes positivos a serotipo 4 (392 pb). Línea 3: paciente positivo a serotipo 2 (119 pb). Línea 4: paciente positivo a serotipo 1 (482 pb). Líneas 5 y 7: pacientes positivos a serotipo 3 (290 pb). Línea 8: control positivo a serotipo 1 (482 pb). Línea 9: control positivo serotipo 2 (119 pb). Línea 10: control positivo serotipo 3 (290 pb). Línea 11: control positivo serotipo 4 (482 pb).

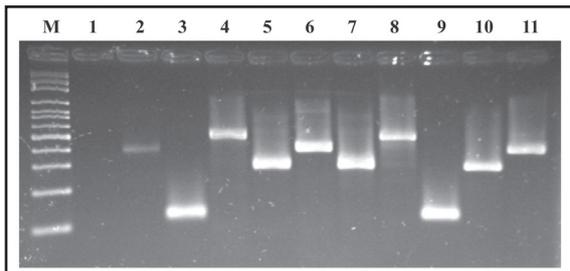


Fig. 2. Distribución de casos positivos de VDEN por grupo etario.

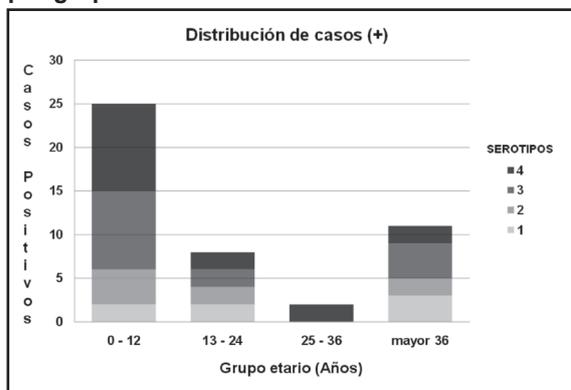


Tabla I. Distribución del VDEN según serotipos.

Serotipo	n	%
Dengue 1	7	15,2
Dengue 2	8	17,4
Dengue 3	15	32,6
Dengue 4	16	34,8
Total	46	100

concuera con diversos estudios realizados en países endémicos en América Latina y Asia (WHO, 2009, Documento en línea disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>; Nogueira, 2005, *J Pediatr*; **81**: 191-192). Cabe mencionar a su vez, que las formas complicadas de dengue aparecen con mayor frecuencia en los niños que han tenido dengue previamente y en aquellos neonatos a los que la madre les ha transferido anticuerpos anti-dengue, es decir, presentan un riesgo mayor a dengue hemorrágico en infecciones secundarias (Gimenez *et al.*, 2011, *Pediatr (Asunción)*, **38**: 12-16).

En nuestro país, las epidemias de VDEN han sido asociadas a diferentes genotipos: VDEN-1 y VDEN-2 (1989 – 1990), VDEN-2 (1998), VDEN-3 (2003), VDEN-1 (2006-2008) (Camacho *et al.*, 2009, *Salus on line* **12**: 73-87). La mayoría de estos estudios se han realizado en la ciudad de Maracay, Edo. Aragua. Recientemente, en un estudio longitudinal realizado en esta ciudad, entre 2006-2007, se detectaron los cuatro tipos del VDEN, teniendo el DEN-1 la mayor presencia (65%) y observándose que la infección fue mayor en los pacientes <15 años (Espino *et al.*, 2010, *Bol. Mal. Salud Amb.*, **1**: 65-74). Para el año 2010, la circulación viral en Aragua fue DEN-3 (38,9%) > DEN-2 (24,5%) > DEN-1 (20,3%) > DEN-4 (17,1%) (LARDIDEV, 2010, datos no publicados). Este resultado es similar al hallado en nuestro estudio para el DEN-3 (32,6%) pero diferente a la proporción de DEN-4 (34,8%). Estas fluctuaciones anuales en la abundancia de un determinado tipo de virus depende, entre otros, de la frecuencia con que la población se haya infectado con ese tipo en particular. Es decir, una población que tenga una inmunidad elevada a un tipo de virus presentará resistencia a la infección por ese tipo y por lo tanto proporcionará una barrera a la transmisión del mismo (Kuno, 1997 In: Gubler & Kuno. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Eds. CAB International, NewYork; p 61-80).

Generalmente, las muestras clínicamente positivas para dengue no son todas positivas por RT-PCR. Datos de Aragua (LARDIDEV, datos no publicados) indican que para los años 2009, 2010 y 2011 las muestras positivas por RT-PCR representaron el 37,4%, 49,1% y el 28,1%. En nuestro estudio sólo el 46% de las muestras con sintomatología para VDEN fueron positivas a algún tipo. Esto se explica si la toma de la muestra no se realizó en la fase virémica de la enfermedad y/o al manejo inadecuado de la misma durante el transporte al laboratorio (falta de refrigeración adecuada). Aunado a esto, está el hecho de que la fiebre de dengue puede confundirse con otras enfermedades siendo grave en los casos de leptospirosis (Flannery *et al.*, 2001, *J. Trop. Med. Hyg.*, **65**: 657–663). De ahí la importancia de realizar diagnósticos moleculares confirmatorios para esta última enfermedad, cuando el resultado sea negativo para VDEN.

En conclusión la circulación de los cuatro tipos del VDEN en la ciudad de Valencia conlleva a la creciente sensibilización de la población a cada uno de los diferentes tipos y al aumento de la probabilidad de que los casos graves de dengue sean más frecuentes, lo que indica la necesidad de incrementar la vigilancia epidemiológica de esta arbovirosis en la zona, siendo el diagnóstico específico y temprano de la infección uno de los factores claves para lograr tal objetivo.

CONFLICTO DE INTERESES: Ninguno

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Lcda. Jenny Molina por el procesamiento de algunas muestras y al TSU José Rivero por la preparación de materiales y reactivos para el desarrollo del trabajo. Esta investigación fue financiada por el MPPCTI / FONACIT, Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911, Subproyecto Dengue N° 2008000911-1.

Recibido: 08/06/2011
Aceptado: 04/02/2012