

DIAGNOSTICOS DEL DENGUE

Kaline Aires de Souza Fávero*, Mauricio Peña Rodríguez*, Katherine Rodríguez Ortiz**

* Estudiantes de medicina UNSLP

** Docente de Microbiología UNSLP

RESUMEN

El dengue es una enfermedad transmitida por el mosquito de la familia Aedes, principalmente el Aedes aegypti que transmite el virión mediante una picadura. La enfermedad puede producir unos signos y síntomas de relevancia que son producto de la respuesta inmunitaria corporal como señal de defensa ante la detección de invasión viral. El diagnóstico clínico es el primer paso ante un posible caso. El diagnóstico de laboratorio permitirá confirmar la sospecha mediante las siguientes pruebas: serológicas, detección de antígenos, RT-PCR, aislamiento del virus, inmunofluorescencia, biomarcadores.

Palabras Clave: Dengue, ELISA, PCR.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito del género y especie *Aedes aegypti*; de hábitat tropical y subtropical muy frecuente en varios países. Es más en los últimos años, su incidencia ha aumentado con la expansión geográfica poblacional.

El virión es de genoma ARN, esférico, pequeño (50 nm), monocatenario de polaridad positiva, que contiene múltiples copias de tres proteínas estructurales, una membrana de doble capa derivada del huésped y una copia única de un genoma ARN. El virus abarca cuatro

serotipos distintos DEN -1 a DEN-4. El criadero de los huevos depositados por las hembras son los recipientes que contengan agua estancada limpia, pero aun en condiciones de ausencia de hidratación estas pueden mantenerse viables durante un tiempo prolongado. (Rampazzo et.al, 2014), (OMS, 2009).

El objetivo principal es presentar una actualización de los métodos diagnósticos clínico y laboratorio.

Las pruebas diagnósticas son: Examen clínico, Prueba del Torniquete y Pruebas de laboratorio (incluido el diagnóstico molecular).

DIAGNOSTICO CLÍNICO DEL DENGUE

Las pruebas clínicas son la determinación de signos y síntomas de alarma.

Los cuales son. Los presuntivos: (vivir en áreas endémicas de dengue, fiebre, anorexia, náuseas, erupción cutánea, malestar, dolores, leucopenia y prueba del torniquete positiva) y los signos de alerta como: dolor abdominal o abdomen blando, vómitos persistentes, acumulación clínica de líquidos, sangrado de mucosas, letargo o agitación y hepatomegalia > 2cm.

Aquellos pacientes que presenten un cuadro benigno de fiebre o sensación de alza térmica, asociado a producir malestar en general, debilidad física y convalecencia prolongada. Se denomina como dengue clásico (DC) el cual puede o no presentar manifestaciones hemorrágicas menores. En el otro extremo del espectro clínico, las manifestaciones más severas referidas al dengue hemorrágico (DH) y al síndrome de choque por dengue (SCD) (Hoyos Riveral & Pérez Rodríguez, 2010).

Además de la fiebre. Los pacientes debían tener dos o más de las siguientes manifestaciones: cefalea, dolor retroorbitario, mialgia, artralgia, erupción cutánea, manifestaciones hemorrágicas, leucopenia, osteomalgias, náuseas, odinofagia,

vómito, debilidad y exantema. En algunas ocasiones, este cuadro clínico también se acompaña de diarrea y síntomas respiratorios.

Las manifestaciones hemorrágicas en el dengue clásico; aunque menos frecuentes, no son comunes y pueden variar según el caso de leves a severas. Presentándose como petequias, equimosis, sangrados gingivales o digestivos, hematuria macro y microscópica, menorragia y otras. La leucopenia a predominio de neutrófilos, y leve trombocitopenia son hallazgos usuales en los resultados de laboratorio.

Sin embargo se puede presentar un exantema caracterizado inicialmente por vesículas puntiformes en la parte posterior del paladar blando. En algunos casos se describe un intenso patrón eritematoso con áreas blanquecinas pálidas de piel normal. Patrón denominado como "lagunas blancas en un mar rojizo".

También se puede observar erupción cutánea de tipo máculo-papular; generalmente entre el segundo y sexto día de la enfermedad. Las máculas papulosas cutáneas son observables en el tronco; la cual se extiende hacia todo el cuerpo. Puede ser pruriginosa y generalmente termina descamándose donde generalmente aparece al comienzo de la fiebre o coincide con un segundo pico febril a los 3-5 días de

aparecida la enfermedad. Puede darse una erupción cutánea petequiral tardía, dispersa o confluyente; generalmente al final de la fase febril o después de esta (Hoyos Rivala & Pérez Rodríguez, 2010).

Algunos de los aspectos clínicos dependen fundamentalmente de la edad del paciente. El dolor abdominal generalizado por ejemplo ha sido observado más frecuentemente en niños. Esto hace difícil diferenciar clínicamente el dengue (DENV) de otras entidades que se presentan tempranamente con síntomas inespecíficos; tales como: influenza, rubéola, gastroenteritis, fiebre tifoidea, leptospirosis, entre otras (Aralí et al, 2006).

Por lo tanto la importancia de hacer también las otras pruebas presentadas a continuación:

Prueba del torniquete (Fragilidad Capilar)

A pesar del gran número de pruebas disponibles para el diagnóstico de dengue, muchas zonas endémicas no pueden permitirse realizarlas esto origina la necesidad del desarrollo de métodos fáciles y económicos para el diagnóstico clínico. Tal es el caso de la prueba del torniquete (TT), indicado por la OMS en 2011 como uno de los criterios primarios de diagnóstico de dengue, a pesar de los diferentes resultados clínicos.

La prueba de torniquete se realiza mediante el inflado de un manguito de presión arterial a una mitad de camino entre la presión sistólica y diastólica durante 5 minutos. Luego se realiza el recuento de las petequias (pequeñas manchas hemorrágicas en un círculo de 5 cm de diámetro). (Costa et al., 2013).

El rango de referencia: Ninguna petequia o hasta 10 petequias en un área de 5 cm; ESCALA: 0 a 10 = 1; (+) de 10 a 20 = 2; (+) de 20 a 50 = 3.

Si existen valores aumentados: pueden indicar coagulación intravascular difusa, disminución del fibrinógeno y de protrombina, deficiencia de factor VII, trombocitopenia, tromboastenia, enfermedad de Von Willebrand y deficiencia de vitamina K. Puede estar asociado a afecciones no relacionadas con los trastornos de la coagulación como escarlatina, hipertensión, diabetes, gripe, sarampión, escorbuto (OMS,2009).

Sería esencial identificar el dengue en la primera consulta, a fin de ofrecer una atención oportuna y específica al paciente para así disminuir su morbimortalidad (Aralí et al, 2006).

Diagnostico laboratorial del dengue

Pruebas diagnósticas específicas

Las pruebas disponibles son: (serológicas) para la detección de anticuerpos IgM e IgG que son las más baratas, pero menos sensibles y específicas; los cuales son métodos indirectos no utilizados de manera frecuente por los profesionales. Los métodos directos pueden incluir al aislamiento del virus, detección del genoma y de la glucoproteína NS1. Que son más confiables, más sensibles, más específicos y costosos; se cree que las alteraciones bioquímicas pueden utilizarse como herramientas predictivas de dengue (Villar, et al., 2013).

Otros métodos actuales disponibles son: la detección de los ácidos nucleicos (RT-PCR normal y en tiempo real, ELISA.), las pruebas serológicas como MAC-ELISA® (OMS, 2009), (Gonzalves et.al, 2012).

Pruebas serológicas: IgM, IgG, IgA, DENV IgM y MAC ELISA

Los métodos serológicos son muy importantes en el diagnostico primario de las infecciones de dengue. Entre las pruebas serológicas disponibles en nuestro entorno existen los métodos de inmunoensayo de enzimas que

pueden detectar presencia de IgM específica asociada con la infección por dengue agudo después del quinto día de enfermedad (Aparecida et al., 2010).

Una vez realizada la prueba serológica de detección de anticuerpos. Si se detecta IgM (+) Indica infección primaria; IgG (+) Indica infección secundaria contraída anteriormente, IgM/IgG (-) Si no fueron detectados anticuerpos y finalmente aparición de IgM e IgG, se debe repetir el test entre el 3º o el 5º día si hubiera sospecha clínica (Rampazzo et al., 2014).

El uso de las técnicas basadas en la saliva se cree que podrían abordar la fase temprana de la enfermedad. Porque se considera útil a la saliva por ser rica en IgA. Su concentración es 100 veces mayor que la de IgM y 14 veces que la IgG. Por lo tanto debe servir como una buena diana para el diagnóstico precoz del dengue (Yap, Kumar, Ching; 2011).

Es importante evaluar las características en función a la sensibilidad y la especificidad con el fin de asegurar un diagnóstico preciso y rápido de la infección. El DENV IgM ELISA es una prueba serológica fiable, rápida, sensible y específica para la detección de infecciones agudas o recientes del virus del dengue. Es en comparación más ventajoso con el MAC-ELISA®

(Elisa de búsqueda de anticuerpos IgM) ya que los resultados pueden obtenerse en 1 día (5 h), mientras que el segundo requiere de 2 a 3 días (Namekar, et.al; 2013).

Detección de antígenos

El desarrollo más reciente de la proteína no estructural 1 (NS1), la detección de antígeno DENV en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la rápida plataforma de flujo lateral ha ofrecido a los laboratorios clínicos una herramienta eficaz para el diagnóstico precoz durante la fase febril de la enfermedad (Yap, Kumar, Ching; 2011).

Las pruebas de sensibilidad son utilizadas para la detección de la glicoproteína (NS1) DENV usando las concentraciones de la misma glicoproteína de cada serotipo (Falconar, Romero; 2013).

DIAGNOSTICO MOLECULAR

RT-PCR

Desde la década de los 90, se han desarrollado varias pruebas de reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Estas ofrecen mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento viral, en un tiempo mucho más rápido. La RT-PCR *in situ* ofrece la capacidad de detectar el ARN del dengue en

tejidos embebidos en parafina. Todas las pruebas para la detección de ácido nucleico comprenden tres pasos básicos: extracción y purificación del ácido nucleico, amplificación del ácido nucleico, y detección y caracterización del producto amplificado (PAHO, 2011).

Esta técnica es capaz de detectar el genoma de cualquiera de los cuatro serotipos del dengue, pero incapaz de identificar la infección específica DENV serotipo.

Se debe considerar preferentemente el RT-PCR para diagnosticar infecciones del dengue en los pacientes que buscan la atención médica hasta cinco días después de la aparición de los síntomas; donde los resultados en sangre de la prueba de ELISA recogidos durante este período de la enfermedad se deben utilizar para demostrar la seroconversión o aumento de los títulos de anticuerpos en combinación con un seguimiento de la muestra, pero no para confirmar el diagnóstico con una sola muestra de suero. Sin embargo, también debe señalarse que un resultado de la prueba RT-PCR negativo no excluye una infección de dengue (Wichmann et al., 2006).

De la misma manera es una técnica que se usa a diario en muchos laboratorios y que se incrementó cuando apareció la modalidad de

PCR en tiempo real, permitiendo el establecimiento y la aplicación de nuevos protocolos experimentales más precisos que generen resultados confiables y reproducibles. Por todo ello, difundir los fundamentos de la PCR es un primer paso para conocer una de varias herramientas tecnológicas con las que se cuenta para el estudio de los ácidos nucleicos (Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo, 2013).

Aislamiento del Virus del dengue

Este examen se realiza mediante una prueba de inmunofluorescencia para la detección del antígeno, usando anticuerpos monoclonales específicos para el serotipo y anticuerpos reactivos al grupo de los *flavivirus* o anticuerpos monoclonales reactivos al complejo de dengue. El aislamiento del virus seguido de una prueba de inmunofluorescencia para confirmación, generalmente requiere 1 a 2 semanas y sólo es posible si la muestra se transporta y almacena correctamente para preservar la viabilidad del virus (OMS,2009). Es una prueba que requiere experiencia e instalaciones específicas. Por lo tanto es menos realizada en relación a las otras pruebas presentadas anteriormente por su elevado costo.

Las ventajas de esta línea celular son su facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento (PAHO, 2011).

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) o Técnica de Anticuerpos Fluorescentes se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo. Se considera un fluorocromo a una sustancia que al ser excitada por una onda luminosa, es capaz de emitir luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la de la onda que provoca la excitación. El fluorocromo de más amplia aplicación en esta técnica es el iso-tiocianato de fluoresceína (PAHO, 2011).

Es específico y posible identificar el serotipo usando anticuerpos específicos. Como limitaciones, se tiene que tener instalaciones para el cultivo de la célula y microscopía fluorescente, porque toma más de 1 semana realizarlo; No es posible diferenciar entre la infección primaria y la secundaria.

Biomarcadores

Villar et al. (2013) seleccionaron al azar 125 casos con dengue grave y 120 controles con dengue no grave para evaluar los niveles séricos de lactato-deshidrogenasa (LDH), creatina cinasa (CK), proteína C reactiva (PCR) y albúmina, en sueros obtenidos en las primeras horas de la enfermedad. Para evaluar el valor diagnóstico de cada biomarcador temprano de gravedad, se

establecieron puntos de corte con una sensibilidad del 90 % en la detección de casos graves, la población infantil entre 5 y 14 años predominó en el estudio (64 %).

En los grupos evaluados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según edad, sexo ni tiempo de evolución de la enfermedad, pero si se encontraron diferencias significativas en los niveles de los marcadores bioquímicos LDH, PCR y albúmina, pero no en los de la CK; los niveles de LDH y PCR fueron los más altos y de albúmina los más bajos. Al evaluar la asociación entre los niveles de PCR con la gravedad se encontró que en los primeros días de enfermedad se tienen niveles inferiores a 9,8 mg/L lo que podía reducir el riesgo de sufrir posteriores complicaciones. Debido a que la PCR hace parte de las proteínas sintetizadas durante la fase aguda de un proceso infeccioso o inflamatorio, el aumento de PCR es influenciado por la infección en curso.

La síntesis de proteínas de la fase aguda en el hígado es estimulada principalmente por la interleucina 6 (IL-6), otro biomarcador. Porque durante las primeras horas de la enfermedad, se desencadena la liberación de una cascada de citocinas (donde la más abundante es la IL-6) como respuesta al proceso

infeccioso, fenómeno que juega un papel importante en su patogenia.

Se ha demostrado que el FNT α (factor de necrosis tumoral) activa células endoteliales y puede iniciar eventos que implican la disfunción de las mismas así que podría participar en algunas de las manifestaciones clínicas y de laboratorio observadas en pacientes con dengue hemorrágico y síndrome del choque del dengue; es considerada una molécula antiviral que puede tener importancia en la atenuación de la infección por el virus del dengue (Villar, et. al; 2013).

CONCLUSIÓN.

El dengue sigue siendo una enfermedad endémica en las Américas. Por eso la importancia de reconocer los signos y síntomas evidentes de una posible infección.

En el examen clínico cuando un paciente presenta principalmente fiebre alta y persistente, cefalea, dolor retro orbitario, mialgia, artralgia, erupción cutánea, manifestaciones hemorrágicas, osteomalgias, náuseas, odinofagia, vómito, debilidad y exantema. En algunas ocasiones, este cuadro también se acompaña de diarrea y síntomas respiratorios se debe sospechar que es un caso de dengue.

El profesional debe aplicar además, la prueba del torniquete como una

medida clínica. Posteriormente debe solicitar pruebas de laboratorio como las pruebas serológicas específicas por ejemplo: IgM, IgG, IgA, MAC ELISA, son más sencillas, menos costosas y no requieren un laboratorio específico equipado para realizarlas.

Este artículo puede ser útil para direccionar a los profesionales en la realización de una buena anamnesis y examen físico para llegar a un diagnóstico más eficiente y preciso de la enfermedad.

Se sugiere hacer nuevas investigaciones acerca de este tema, para que se pueda dejar más claro y de alguna manera ampliar la información acerca del diagnóstico adecuado del dengue.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, P.O.A., Granja, F., Meneses C. A., Nascimento I.A.S., Sousa D.D., Lima Júnior W.P. & Naveca F.G. False-Negative Dengue Cases In Roraima, Brazil: An Approach Regarding The High Number Of Negative Results By Ns1 Ag Kits. (2014). Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 56(5):447-450. doi: 10.1590/S0036-46652014000500014.
- Aparecida L.C.B., Martins A.M., Aquino V.H., Badra S.J., Moraes L.T.F. Padronização e uso de um método inmunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no diagnóstico rotineiro do dengue. (2010). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(3):268-271.
- Aralí R. M.V., Díaz F.A.Q., Villar L.A.C. Dificultad para el diagnóstico clínico temprano del dengue en un área endémica y su impacto sobre el manejo médico inicial. (2006). Rev Méd Chile; 134: 1153-1160.
- Bisordi I., Rocco I.M., Suzuki A., Katz G., Silveira V.R., Maeda A.Y., De Souza R.P., Bassi M.G., Del Tedesco E. F., Freitas E., Bessa T.A. F. & Dengue-Ns1 Group. (2011). Evaluation Of Dengue Ns1 Antigen Detection For Diagnosis In Public Health Laboratories, São Paulo State, 2009. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 53(6):315-320. doi: 10.1590/S0036-46652011000600003.
- Catalogado por el Centro de Información y Documentación OPS/OMS Bolivia. Organización Panamericana de La Salud. Organización Mundial de La Salud. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. (2010). La Paz, Bolivia.
- Costa A.A., Laporte G.O., Ileila L.N., Guedes L.A.F., Santos R.P., Rezende H.H., Carvalho A.J.V. (2013). Evaluation of the diagnostic value of the tourniquet test in predicting severe dengue cases in a population from Belo

- Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(5):542-546, <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0161-2013>.
- Costa, C.A., Santos I. G. C., Barbosa M. G. (2009). Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(6):677-681.
 - Falconar A.K.I., Romero C.M.E.V. Un ensayo simple, barato, robusto y sensible dot-blot para la igualdad de la detección de la no estructural-1 glicoproteína de todos los serotipos del virus del dengue. (2013). Virología Diario, 10: 126 doi: 10.1186 / 1743-422X-10-126.
 - Gonçalves M.C., Ribeiro R.M.N., Bispo A.M.F., Alves A.F., Rocha M.Q.L., Rodrigues N.C.F., Bruycker F.N., Bastos J.S.S., Conrado P.G.N., Alves S.S., Lourenço R.O., Barreto F.S. (2012). Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(7).
 - Hoyos A.R., Pérez A.R. (2010). Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del Dengue. Revista Cubana de Salud Pública. 2010; 36(1)149-164.
 - Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" - Ministerio de Salud Pública. Laboratorio de Arbovirus Departamento de Virología Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector. Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio de las Enfermedades Viricas. Técnicas De Laboratorio Para El Diagnóstico Y La Caracterización De Los Virus Del Dengue. (2009). Habana, Cuba.
 - Madhuri Namekar , Esther M. Ellis , Maile O'Connell , Joe Elm , Alexandra Gurary , Sarah Y. Parque , Allison Imrie y Vivek R. Nerurkar. (2013). Evaluation of a New Commercially Available Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infection Journal of Clinical Microbiology. Volume 51. Number 9. p. 3102–3106.
 - Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Alerta Epidemiologica: Dengue. 2013.
 - Rampazzo A.X., Severiano M.F., Martins F.L. , Kanaa S. Manifestações clínicas na dengue: Diagnóstico laboratorial. (2014). JBM. Vol 102. nº2.
 - Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la

- olimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. (2013). Tecnología en salud. Investigación en Discapacidad. Vol. 2, Núm. 2. pp 70-78.
- Villar L.A.C., Lozano A.P., Salgado D.G., Herrán Ó.F. Alteraciones bioquímicas como marcadores predictores de gravedad en pacientes con fiebre por dengue. (2013). *Biomédica*;33(Supl.1):63-9. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.732>.
 - Wichmann O., Stark K., Shu Pei-Yun, Niedrig M., Frank C., Huang Jyh-Hsiung and Jelinek T. (2006). Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travellers. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:120 doi:10.1186/1471-2334-6-120.
 - Yap G., Kumar B.S., Ching L.N. El uso de saliva para el Dengue Early Diagnosis. (2011). *PLoS Negl Trop Dis.* 10;5(5):e1046. doi: 10.1371/journal.pntd.0001046.