

Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica¹

Raquel E. Ocazonez, Ph.D.², Fabián Cortés, Bact.³, Luis Angel Villar, M.Sc.⁴

RESUMEN

Introducción: El control del dengue depende de los datos de la vigilancia basada en el laboratorio. El objetivo de este estudio fue establecer las diferencias en número de casos (IgM positiva) y serotipos del virus según la estrategia de vigilancia.

Materiales y métodos: Se compararon los resultados de dos estrategias de vigilancia. Primera (SIVIGILA local): de 337 casos con sospecha clínica de dengue se colectó un único suero (agudo o convaleciente) que se almacenó a 4°C. Se utilizó el estuche UMELISA DENGUE (IPK, Cuba) para detectar anticuerpos IgM y se hicieron intentos de aislamiento del virus en células C6/36. Segunda: de 318 casos sospechosos se colectaron sueros pareados que se almacenaron a -70°C, se usó una prueba local de MAC-ELISA y se intentó el aislamiento del virus como en la primera. Algunos sueros procesados por el MAC-ELISA se analizaron también por el UMELISA y los estuches Dengue IgM-capture ELISA (PANBIO) e IgM*ELISA anti-dengue (IPK, Cuba).

Resultados: Se encontraron más casos IgM+ con la primera que con la segunda estrategia tanto con sueros agudos como convalecientes. Esto es, 61.1 vs 22% ($p < 0.001$) y 86.8 vs 49.3% ($p < 0.001$), respectivamente. Los resultados del MAC-ELISA concordaron 85% ($k = 0.29$) con los del UMELISA, pero 90.4% ($k = 0.84$) y 100% ($k = 1$) con los estuches de PAMBIO e IgM*ELISA, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia del dengue en casos de la segunda estrategia, cuando el resultado de la serología con suero agudo o con pareado se comparó: 70 (22%) vs 155 (48.7%) ($p < 0.001$). El aislamiento viral fue más exitoso de los sueros almacenados a -70°C que a 4°C: 17.8% vs. 4.7% ($p < 0.001$). Se identificaron los 4 serotipos del virus. Se discuten la especificidad del UMELISA DENGUE y las consecuencias en el control del dengue en relación a la estrategia de vigilancia.

Conclusiones: Se requiere evaluar la especificidad del estuche UMELISA considerando la alta frecuencia del dengue en casos con sospecha. El análisis de sueros pareados en la vigilancia del dengue es necesario para obtener información confiable.

Palabras clave: Dengue; ELISA de captura; Aislamiento viral; Serotipos virus dengue.

El dengue es una enfermedad causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus del mismo nombre (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4), que son transmitidos a los humanos por mosquitos del género *Aedes*^{1,2}. En los últimos 25 años ha emergido como la arbovirosis de mayor prevalencia en el mundo. Se estima que cerca de 492,820 casos ocurrieron en las Américas en la década de 1990 de los cuales más de 77,000 fueron hemorrágicos, pero

sólo en el año 2002 se informaron 1'015,420 casos siendo 14,374 severos^{3,4}. En Colombia, entre 1998 y 2003 se informaron 283,357 casos pudiéndose clasificar 27,997 (9.8%) como hemorrágicos. De estos, 46,615 (16.4%) fueron en Santander (4,450 severos), convirtiéndose en uno de los departamentos que más casos informa al Ministerio de Salud y Protección Social⁵⁻⁷.

1. Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS (Proyecto N° 11020413042) con el apoyo de la Secretaría de Salud del Departamento de Santander (Contrato N° 133-99).

2. Profesora Asociada, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Directora Laboratorio de Arbovirus, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Laboratorio de Virología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. e-mail: raqueoca@hotmail.com

3. Bacteriólogo, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. e-mail: karrancho@hotmail.com

4. Profesor Asociado, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina. Investigador Asociado, Centro de Investigaciones Epidemiológicas (CIE), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. e-mail: luisangel@intercable.net.co

Recibido para publicación marzo 19, 2004

Aprobado para publicación marzo 15, 2005

Ante la carencia de tratamiento farmacológico e inmunoprofilaxis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió la estrategia global para el control del dengue que incluye, entre otros componentes, la vigilancia basada en el laboratorio⁸. Esta permite estimar el número de casos confirmando la enfermedad en los sospechosos y conocer los serotipos del virus que estén circulando. Lo primero se hace rutinariamente por serología que detecta anticuerpos IgM, siendo el MAC-ELISA el procedimiento más utilizado⁹. Para esto es indispensable analizar sueros pareados y demostrar seroconversión o aumento cuádruplo del título del anticuerpo. Cuando la serología se realiza en un único suero, el resultado positivo indica un caso probable y no es confirmatorio, porque los anticuerpos pueden ser de una infección pasada reciente, pues la IgM permanece hasta por 90 días después de una infección. Por otro lado, el resultado negativo en suero de los primeros días de síntomas no descarta el dengue porque en algunas personas la concentración de la IgM es aún insuficiente para encontrarse en el ensayo^{10,11}.

La vigilancia de los virus forma parte del control del dengue porque la entrada de un serotipo nuevo o la reaparición de uno ausente por largo tiempo, se han asociado con epidemias y aumento del dengue hemorrágico (DH). La entrada del DEN-2 en Cuba en 1981^{12,13} y la reaparición del DEN-3 en Nicaragua en 1994¹⁴, produjeron las mayores epidemias de DH en América. El aislamiento del virus en cultivo de células de mosquito y la posterior identificación del serotipo con anticuerpos monoclonales, ha sido el procedimiento utilizado de rutina para la identificación de los virus. El éxito del mismo depende del día de recolección y preservación adecuada del suero^{9,15}.

La vigilancia del dengue basada en el laboratorio en áreas endémicas colombianas, incluido el departamento de Santander, se realiza de forma pasiva. Esto es, de cada caso sospechoso se recolecta un único suero, con mayor frecuencia durante los primeros días de síntomas cuando el paciente solicita la atención médica, el cual se remite al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud (LDSP) de cada departamento. En esta dependencia las muestras se procesan para buscar IgM y una alícuota se remite al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (Bogotá) para el aislamiento del virus. En tres de los departamentos donde el dengue ocurre, la vigilancia de los serotipos se desarrolla en laboratorios locales. Como las acciones de control se fundamentan en la información obtenida de la vigilancia basada en el laboratorio, los autores de este artículo decidieron realizar este estudio. El objetivo fue comparar la frecuencia de casos de dengue y el número

de virus aislados según dos estrategias de vigilancia que se diferenciaron en los siguientes aspectos:

- a. Número de sueros recolectados de cada caso sospechoso (único o pareado) y momento de luego de inicio de síntomas (agudo o convaleciente).
- b. Almacenamiento del suero (4°C o -70°C) y
- c. Protocolo del MAC-ELISA (estuche comercial o prueba local).

MATERIALES Y MÉTODOS

Casos. Se incluyeron 655 casos febriles con sospecha clínica de dengue de los ocurridos en Santander en los años 2000, 2003 y 2004. En estos años el sistema de vigilancia local no informó de brotes^{7,16}. Los pacientes se seleccionaron si presentaban fiebre acompañada de dos o más síntomas como dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, erupción cutánea, y con o sin manifestaciones hemorrágicas (petequias, epistaxis, hemoptisis o sangrado de encías). Se excluyeron quienes tuvieron algún foco de infección aparente como otitis, infección urinaria, enfermedades crónicas y otros.

Estrategias de vigilancia

1. Con sueros no-pareados. Se realizó por el sistema de vigilancia (SIVIGILA) de Santander en el año 2000. Se incluyeron 337 casos febriles del total de informados a la Secretaría de Salud por las instituciones de salud que los atendieron. De cada uno se colectó un único suero antes o después del sexto día de síntomas y luego se remitió al Laboratorio Departamental de Salud Pública. En este laboratorio los sueros se almacenaron a 4°C antes de ser procesados para detectar anticuerpos IgM usando el estuche UMELISA DENGUE como se describe adelante. De los sueros agudos (antes del sexto día de síntomas) almacenados máximo 8 días, se remitió una alícuota al Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP/UIS), para aislamiento del virus en cultivo de células como se describe luego. La información sobre fecha y día de recolección del suero se consultó en la ficha de informe que acompañaba la muestra.

2. Con sueros pareados. Se incluyeron 318 casos atendidos en clínicas privadas entre los años 2003 y 2004. De cada uno se colectó un suero el día de la consulta (hasta con 5 días de síntomas) y 10 ó 15 días después una enfermera participante en el estudio visitó al paciente en su residencia para colectar el suero convaleciente. Las muestras se remitieron al Laboratorio de Virología del CINTROP/UIS en las 6 horas siguientes a su colecta. Aquí se almacenaron a -70°C

por una semana y luego se procesaron para detectar anticuerpos IgM usando un protocolo estándar del MAC-ELISA y aislar el virus como se describe adelante.

Detección de IgM

1. Estuche UMELISA DENGUE (Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba). Según las instrucciones del fabricante el procedimiento brevemente consistió en: 10 µl del suero se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-IgM humana ligado a pozos de tiras ultramicroELISA por 1 hora a 37°C; se hicieron 6 lavados con tampón fosfato y enseguida se adicionaron 10 µl del antígeno. Después de incubación y lavados en las mismas condiciones, se adicionaron 10 µl del anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (anti IgG/FA) por 1 hora a 37°C y después de lavar se agregaron 10 µl del sustrato (4-metilumbiferil fosfato). Al término de la incubación a temperatura ambiente por 30 min la fluorescencia se leyó en un lector SUMA (IPK, Cuba). Los sueros con valores de densidad óptica mayor o igual a 0.3 se consideraron positivos. Los autores fueron autorizados por la Secretaría de Salud para consultar los valores de densidad óptica en el libro de registros del Laboratorio de Salud Pública.

2. MAC-ELISA. Se utilizó el protocolo estándar¹⁸. Se sensibilizaron por 18 horas a 4°C, microplacas de 96 pozos con 100 µl de anticuerpo anti-IgM humana (Sigma St. Louis, MO). Después de lavar 3 veces con tampón fosfato (PBS pH 7.4) se adicionaron 50 µl del suero (1:40) a cada pozo y las placas se incubaron por 2 horas a 37°C. Después de 5 lavados se agregaron 50 µl de antígeno por 18 horas a 4°C y de nuevo se lavaron y enseguida se adicionó 50 µl de anticuerpo anti-dengue conjugado con peroxidasa (6B6C; CDC, Dengue Branch, Puerto Rico). Las placas se incubaron por una hora a 37°C, se lavaron y luego se adicionaron 100 µl del sustrato (TMB; Sigma St. Louis, MO). La lectura se realizó a 450 nm en un lector de ELISA (Sensident Scan Merck) y el valor del punto de corte se calculó como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros negativos más 2 ED. Los sueros que presentaron la DO igual o mayor al punto de corte se consideraron positivos. Cuando las dos muestras del mismo paciente resultaron positivas, la muestra de convalecencia se diluyó 4 veces y se hizo de nuevo el proceso. Un resultado positivo en estos casos se consideró infección aguda por dengue y el negativo infección pasada reciente.

Validación del MAC-ELISA. Grupos de sueros pareados procesados por el MAC-ELISA se analizaron también por el UMELISA (n=28) y los estuches IgM*ELISA anti-dengue (IPK, La Habana, Cuba) (n=55) y dengue IgM-capture ELISA (PANBIO Pty Ltd., East Brisbane, Australia)

(n=29). Las pruebas se realizaron siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante similar al MAC-ELISA con diferencias en el volumen de los reactivos y tiempo de incubación. Con ambos estuches un resultado positivo se consideró cuando el valor de la DO fue 2 ED del promedio de los controles negativos.

Aislamiento del virus. Se utilizaron sueros agudos para infectar células de mosquito *Aedes albopictus* (clon C6/36) mantenidas en medio Leibovitz's (L-15, GIBCO, BRL) suplementado con suero bovino fetal (10%), triptosa fosfato (10%) y antibióticos (penicilina 100 UI/ml; estreptomycin 100 µg/ml) (1%). Brevemente, se adicionaron 100 µl de suero a monocapas celulares crecidas en tubos de vidrio y luego los cultivos se centrifugaron a 2,000 rpm por 30 min y a temperatura ambiente. Después se adicionó 1 ml del medio de cultivo suplementado con 2% de suero bovino fetal y los cultivos se incubaron a 32°C por 8 días¹⁷. La presencia del virus se determinó por inmunofluorescencia directa usando un anticuerpo policlonal anti-dengue marcado con fluoresceína y luego el serotipo se identificó por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos¹⁵. Los anticuerpos fueron gentilmente donados por el CDC, Dengue Branch Puerto Rico.

Diagnóstico del dengue. Según el resultado de las pruebas de laboratorio, el diagnóstico se estableció de acuerdo con los criterios de la OMS⁸ como:

- Caso confirmado:* cuando se encontró seroconversión o aumento de 4 veces el título de la IgM y/o se aisló el virus.
- Caso sin dengue:* cuando no se encontró IgM en suero de la convalecencia.
- Caso probable:* cuando se encontró IgM en una sola muestra de suero y no se aisló el virus.
- Caso no-concluyente:* cuando no se encontró IgM en el suero agudo ni se aisló el virus y cuando no se colectó suero de la convalecencia.
- Caso de infección pasada reciente:* cuando se encontró IgM en el suero agudo y convaleciente sin aumento cuádruplo del título y el virus no se aisló.

Análisis de los datos. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) para determinar la significancia de las diferencias en las frecuencias, utilizando el programa Epi Info versión 5.0.

RESULTADOS

Detección de anticuerpos. En los casos sospechosos la IgM se detectó con diferente frecuencia dependiendo del suero colectado y la prueba (Cuadro 1), en 61.1% vs. 22% de los agudos y en 86.8% vs. 49.3% de los convalecientes analizados por el UMELISA y MAC-ELISA, respectivamente.

Cuadro 1

Detección de anticuerpos IgM por ELISA en casos con sospecha clínica de dengue de acuerdo con el tipo de ensayo y momento de recolección del suero. Departamento de Santander, 2000, 2003, 2004

Ensayo	Sueros N°	Días de síntomas: período						Casos de dengue	
		0-5: agudo			6 y+: convaleciente			N°	%
		N°	IgM+	%	N°	IgM+	%		
UMELISA ¹	337	170	104	61.1	167	145	86.8	249 ⁵	73.8
MACELISA ²	318	318	70	22.0 ⁴	318	157 ³	49.3 ⁴	155 ⁶	48.7 ⁴

1. En sueros no-pareados (SIVIGILA local). 2. En sueros pareados (estudio prospectivo). 3. En 2 no se detectó aumento del título. 4. $p < 0.001$ cuando comparado con el UMELISA. 5. Probables 6. Confirmados.

Cuadro 2

Comparación del resultado del MAC-ELISA con otros ensayos para investigar anticuerpos IgM anti-dengue en casos con sospecha clínica

MAC-ELISA	Suero agudo						Suero convaleciente					
	IPK ¹ n=55		PANBIO ² n=29		UMELISA ³ n=28		IPKn=55		PANBIO ² n=29		UMELISA ³ n=28	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Positivo	10	1	12	0	1	2	32	0	12	0	14	6
Negativo	1	43	2	15	16	9	0	23	2	15	3	5 ⁴

1. IgM ELISA anti-dengue (Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba). 2. Dengue IgM-capture ELISA (Brisbane, Australia). 3. SIVIGILA local (IPK, Cuba) 4. Tres resultaron positivos en el agudo.

te, y estas diferencias fueron significativas ($p < 0.001$). De acuerdo con estos resultados se pudo establecer que 73.8% (249/337) de los pacientes de la primera estrategia (SIVIGILA local) fueron IgM+ en contraste con 48.7% (155/318) de la segunda. De los 155 pacientes IgM+ de la segunda estrategia en 70 (45.1%) el anticuerpo se encontró en ambos sueros, pero 2 de estos (2.8%) no tuvieron aumento cuádruplo del título (infecciones pasadas).

Al comparar el MAC-ELISA con las otras pruebas estos fueron los resultados (Cuadro 2): con el estuche Dengue IgM-capture ELISA (IPK) se obtuvo concordancia en 53 sueros agudos (96.3%; $k=0.88$) y 55 convalecientes (100%; $k=1$) de 55 pareados, resultando 32 pacientes confirmados por ambas pruebas. Con el de PAMBIO, de 29 pareados 27 agudos y sus convalecientes concordaron (93.1%; $k=0.86$) pudiéndose confirmar el dengue en 21 pacientes de los cuales en 2 no se logró por el MAC-ELISA local. Con el UMELISA en 10 agudos (35.7%; $k=-0.1$) y 19 convalecientes (65.5%; $k=0.29$) de 28 pareados los resultados fueron iguales, resultando 17 pacientes confirmados de los cuales 3 no lo fueron por la prueba local. En los casos confirmados con cada uno de los estuches la IgM se detectó en el suero agudo en 31.2 (10/32), 57.1 (12/21) y 100% (17/17) por el del IPK, PANBIO y UMELISA, respectivamente.

Diagnóstico del dengue según la estrategia de vigilancia. Usando un único suero (primera estrategia) el dengue no

se pudo confirmar por serología en ningún de los 337 casos. De estos, 249 (73.8%) resultaron casos probables (IgM+), en 22 (6.5%) el dengue se descartó (IgM- en suero convaleciente) y en 66 (19.6%) el diagnóstico no se pudo concluir (IgM- en suero agudo). En contraste, cuando se usaron sueros pareados (segunda estrategia) el diagnóstico se definió en los 318 casos. Esto es, en 155 (48.7%) el dengue se confirmó, en 161 (50.6%) se descartó y 2 (0.6%) fueron infecciones recientemente pasadas.

Los autores del presente artículo intentaron hacer un análisis más preciso de la exactitud en los datos de la vigilancia según el suero que se analice. Para esto se comparó la frecuencia del dengue en los 318 casos de la segunda estrategia, cuando el resultado de la serología con sueros pareados o con un único suero (agudo o convaleciente) es el que se considera (Cuadro 3). Con muestras pareadas 155 (48.7%) fueron casos de dengue (IgM+), pero con suero de la convalecencia fueron 157 (49.3%) porque se incluyen las 2 personas con infección pasada reciente. En contraste, cuando se utiliza la serología en suero agudo el número de casos disminuyó de 155 a 70 (22%) porque se excluyeron 85 (54.8%) que resultaron IgM+ en la convalecencia y esta disminución fue significativa ($p < 0.001$).

Aislamiento del virus. Se intentó de 170 y 236 sueros de la primera y segunda estrategia, respectivamente (Cuadro 4). De los primeros se aislaron 8 cepas y de los segundos 42,

Cuadro 3
Resultado de la vigilancia serológica del dengue según la estrategia de recolección de sueros.
Departamento de Santander, 2003-2004

Estrategia de recolección de sueros	Casos de dengue ¹				Casos no-dengue ²	
	Detectados		No detectados		Nº/total	%
	Nº/total	%	Nº/total	%		
Pareado	155/318	48.7	0/155	0	163/318	51.3
Convaleciente	157/318 ³	49.3	0/155	0	161/318	50.6
Agudo	70/318 ³	22.0 ⁴	85/155	54.8	248/318	77.9

1. IgM+. 2. IgM- en el suero agudo. 3. Dos fueron infecciones pasadas (IgM+ en ambos sueros sin aumento cuádruplo del título). 4. p<0.001 cuando comparado con el pareado o el convaleciente.

Cuadro 4
Resultado de la vigilancia virológica del dengue en el departamento de Santander según el almacenamiento del suero

Almacenamiento	Intentos de aislamiento		Serotipos N° de cepas				Años
	+/N°	%	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	
4°C x 8 días ¹	8/170	4.7	1	5	-	2	2000
-70°C x 8 días ²	42/236	17.8 ³	1	1	40	-	2003-2004

1. SIVIGILA local . 2. Seis horas siguientes a la recolecta. 3. p<0.001

resultando porcentajes de aislamiento significativamente diferentes: 4.7% y 17.8% (p<0.001). La sensibilidad del método de aislamiento se determinó en personas con dengue confirmado por serología y ésta fue de 26.7% (42/157). El virus se aisló con mayor frecuencia de sueros agudos sin anticuerpos IgM (31.3%; 27/86) que cuando estos estuvieron presentes (21.1%; 15/71) aunque las diferencias no fueron significativas (p=0.147). Se encontraron los 4 serotipos distribuidos temporalmente. El DEN-1 y el DEN-2 se aislaron en los 3 años del estudio (2 y 6 cepas, respectivamente), mientras que el DEN-4 se aisló sólo en el año 2000 (2 cepas) y el DEN-3 entre los años 2003 y 2004 (40 cepas).

DISCUSIÓN

Existen por lo menos dos razones para la vigilancia del dengue basada en el laboratorio. La primera porque se requiere confirmar los casos teniendo en cuenta que existen enfermedades clínicamente semejantes (sarampión, influenza, leptospirosis, fiebre tifoidea, malaria, otras) e igualmente frecuentes. La segunda porque se ha demostrado que el riesgo de epidemias de dengue e incremento de casos hemorrágicos puede depender del serotipo y la cepa del virus que este circulando^{19,20}

En la mayoría de las localidades donde ocurre el dengue la vigilancia de casos se realiza por serología para IgM empleando ELISA de captura (MAC-ELISA). En este estu-

dio se usaron dos protocolos para estudiar pacientes sospechosos durante períodos no epidémicos. En 49.3% y 73.8% se detectó la IgM por el MAC-ELISA o el UM-ELISA, respectivamente. Esta frecuencia fue mayor que la observada durante epidemias en otras áreas endémicas. Por ejemplo, en la de Cuba en 1997 sólo 17.2% de los casos informados al sistema de vigilancia fueron de dengue²¹; en la de Belén, Brasil, entre 1996 y 1997, 21.2%²²; y en la de Nicaragua en 1998, 43%²³. Esas diferencias son posibles teniendo en cuenta que normalmente se informan individuos con otras virosis semejantes al dengue, con mayor frecuencia durante brotes, dada la alarma médica que este produce. Sin embargo, cuando el porcentaje de casos IgM+ se compara con el encontrado en otros estudios de búsqueda activa de casos, el del MAC-ELISA fue más cercano que el del UM-ELISA. Esto es, 49.3% y 73.8% vs. 37%²⁴, 31.7%¹¹ ó 35%²⁵.

Por el diseño del estudio no se pudo concluir si la mayor frecuencia de casos IgM+ por el UMELISA se debió a mayor sensibilidad de la prueba. No obstante, la discordancia de resultados con el MAC-ELISA sugiere mayor sensibilidad pero menor especificidad, considerando la concordancia de los resultados de la segunda con la de los otros estuches; además, porque por el MAC-ELISA local se procesaron sueros previamente analizados en el IPK (Cuba) y los resultados fueron 100% concordantes (Dra. Guadalupe Guzmán, comunicación personal). Otros hallazgos que respaldan la hipótesis de baja especificidad del UMELISA

son los siguientes: a) el porcentaje de casos IgM+ en el suero agudo de casos sospechosos (61.1%) fue superior al de pacientes con dengue confirmado por aislamiento del virus (38.9% hasta 58%)^{11,24,26,27}. Por tanto, un porcentaje como el obtenido con el UMELISA no se esperaba porque normalmente se remiten al SIVIGILA casos que no son de dengue. b) la frecuencia de casos IgM+ según resultados del UMELISA fue similar en años diferentes a los del estudio, tanto en el suero agudo como en el convaleciente.

Los autores descartan algún sesgo en la selección de los sueros que resultara en la mayor positividad del UMELISA, como inclusión de pacientes con mayor probabilidad de sufrir dengue, porque la selección se hizo al azar y los datos se conocieron meses más tarde. Sin embargo, no se puede descartar inexactitud del dato del día de colecta. Esto es, sueros considerados agudos podrían ser del sexto día o más considerando que esta información fue suministrada por el paciente y por lo mismo subjetiva. Un factor que pudiera haber contribuido a la alta positividad del UMELISA es el punto de corte. Cuando se incrementó de 0.3 a 0.8 DO el número de casos IgM+ fue similar a los del MAC-ELISA local. No es conocido por los autores que se hubiesen procesado sueros de individuos sanos residentes en la región para establecer el punto de corte del UMELISA.

La vigilancia virológica es útil para predecir la magnitud y severidad de un brote porque incrementos en la tasa de aislamientos virales, que reflejan emergencia o introducción de un serotipo, se pueden descubrir tempranamente²⁸. Es conocido que el éxito del aislamiento es mayor cuando los sueros se procesan en las primeras horas de la colecta, porque el almacenamiento prolongado a temperaturas inadecuadas disminuye la viabilidad del virus^{9,31,32}. En este estudio se aislaron más cepas de sueros almacenados a -70°C (17.8%), que a 4°C, (4.7%). En el Laboratorio de Arbovirus del CINTROP se encontró que el almacenamiento a 4°C por 8 días de sueros contaminados experimentalmente con DEN-4, disminuye hasta 1,000 veces el número de UFP/ml que se recuperan en el cultivo (datos no mostrados). Por tanto, es prioritario para la vigilancia virológica instruir al personal encargado de la recolección de los sueros sobre la importancia de remitirlos al laboratorio en el menor tiempo posible, o en su defecto almacenarlos por tiempo y a temperatura adecuados; así se podrá aislar con más frecuencia serotipos de baja circulación y descubrir la entrada de un nuevo virus con antelación al brote.

El éxito en el control del dengue depende de cuánto, a través de la vigilancia, se puede predecir el inicio de una epidemia, lo que a su vez depende de la rapidez, calidad e interpretación apropiadas de las pruebas de laboratorio.

Cuando la vigilancia se realiza con un único suero el estimativo del número de casos es impreciso como se confirmó en este estudio. Se puede incluir casos como dengue que en realidad no lo sufrieron o excluir los que si tuvieron (IgM- en suero agudo). Por las dificultades logísticas inherentes al sistema de salud colombiano y al de la misma cultura, es difícil establecer una vigilancia activa para recolección de sueros pareados. Como consecuencia la muestra recomendada sería el suero colectado después del sexto día porque se aumenta la probabilidad de confirmar los casos. Sin embargo, esto tiene los siguientes inconvenientes:

1. La mayoría de pacientes reciben asistencia médica durante la etapa aguda y son pocos con quienes se tiene contacto después de ésta. En la experiencia de los autores, en 2% de los que se siguieron no se consiguió la aceptación para la segunda muestra y de 25 que se citaron telefónicamente ninguno acudió.
2. La posibilidad de conocer los virus circulantes disminuye significativamente porque el aislamiento es exitoso del suero de los primeros 4 días de síntomas.
3. Infecciones recientemente pasadas se podrían informar como agudas (2.8% en este estudio), considerando que la IgM se puede detectar hasta por 3 meses. Vaughn *et al.*²⁴ encontraron 2% de infecciones recientes en niños tailandeses con síndrome febril compatible con dengue.

Los resultados aquí presentados muestran que para una adecuada vigilancia del dengue, en localidades donde es poco factible el seguimiento del paciente, es una prioridad utilizar pruebas que permitan confirmar el caso e identificar el virus simultáneamente en el suero colectado durante la primera consulta. La RT-PCR³²⁻³⁴ y la detección de antígeno por el ELISA³⁵, constituyen alternativas, pero deberán evaluarse a nivel local para determinar su utilidad en términos de sensibilidad y costo-beneficio. Mientras estas se establecen y dadas las dificultades para la recolección de sueros pareados, los autores hacen las siguientes recomendaciones para una mejor vigilancia del dengue basada en el laboratorio:

1. Colectar muestras pareadas en todos los casos que sea posible, remitiendo al laboratorio el suero agudo en las primeras horas.
2. Cuando sólo es posible recolectar un único suero, hacerlo con preferencia en la convalecencia y almacenarlo a -20°C antes de ser remitido al laboratorio.
3. En pacientes hospitalizados recolectar el suero el día de la primera consulta y si el paciente es dado de alta antes del sexto día de síntomas, citarlo al laboratorio para la toma de la segunda muestra.

Siguiendo estas recomendaciones será posible una mayor precisión de los datos y de la magnitud del problema del

dengue, además de identificar tempranamente los factores de riesgo y mantener un sistema de alerta inmediata en prevención de epidemias.

SUMMARY

Background: Dengue control measures depend on the laboratory-based surveillance data. In this study was investigated the differences in dengue cases and viruses isolated in according with surveillance strategy.

Study design and methods: Two surveillance strategies were analyzed in this study. First (Local Surveillance System): single serum sample (acute or convalescent) was collected from 337 dengue suspected cases and then kept at 4°C. IgM antibodies were detected using UMELISA DENGUE kit (IPK, Cuba), and serotypes identification was performed by viral isolation attempts in C6/36. Second: paired serum sample were collected from 318 dengue suspected cases and then kept at -70 °C. IgM antibodies were detected using MAC-ELISA test and virus isolation as above. Some paired sera analyzed by MAC-ELISA were processed by “Dengue IgM-capture ELISA” kit (PANBIO) and “IgM*ELISA anti-dengue” (IPK, Cuba).

Results: More IgM+ dengue cases were detected by the first than second strategy using acute or convalescent serum: 61.1 vs 22% ($p < 0.001$) y 86.8 vs 49.3% ($p < 0.001$), respectively. Dengue diagnosis by MAC-ELISA was concordant in 85% ($K=0.29$) respect to UM-ELISA, but 100% ($K=1$) and 90.4% ($K=0.84$) respect to “IgM ELISA anti-dengue” and “Dengue IgM-capture ELISA” kits. Differences in dengue cases detected by the second strategy were found when serological result with single acute or paired samples was compared: 70 (22%) vs 155 (48.7%) ($p < 0.001$). Dengue virus was isolated more frequently from sera kept at -70 °C than those kept at 4 °C: 17.8% vs. 4.7% ($p < 0.001$). All virus serotypes were isolated. The UMELISA DENGUE test specificity and relationship between impact dengue surveillance and implemented strategy are analyzed.

Conclusions: The specificity of UMELISA DENGUE test require to be evaluated by the high frequency of dengue in suspected cases. Serum paired analyzes in dengue surveillance is necessary to obtain reliable information.

Key words: Dengue; IgM-capture ELISA; Viral isolation; Dengue virus serotypes; RT-PCR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Salud del Depar-

tamento de Santander por permitir la información del UMELISA. Al Dr. Vancen Vorndam del CDC, Puerto Rico, por el suministro de anticuerpos y antígenos y al Instituto Pedro Kourí, Cuba, por el estuche del MAC-ELISA. A Sergio Yebrail Gómez por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

- Gubler JD, Clark CG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 55-57.
- Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno G (eds.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 245-272.
- Pancharoen C, Kulwichit W, Tantawichien T, Thysiakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection: a global concern. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 (Suppl 1): 25-33.
- Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003; 27: 1-3.
- Ministerio de Salud. *Prevención y control del dengue*. Informe ejecutivo, Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA). Bogotá: Ministerio de Salud; 2001.
- Ministerio de Salud. *Prevención y control del dengue*. Informe ejecutivo, Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA). Bogotá: Ministerio de Salud; 2002.
- Rey JJ, Segura AM. La estratificación epidemiológica del riesgo. Una estrategia alternativa en el control del dengue para el área metropolitana de Bucaramanga. *Bol Epidemiol*; 2003: 8-25.
- World Health Organization. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997. p. 12-47.
- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G (eds.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 313-333.
- Ruechusatawat K, Morita K, Tanaka M. Daily observation of antibodies levels among dengue patients detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn Trop Med Hyg* 1994; 22: 9-12.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, et al. Dengue in early phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis* 1977; 176: 322-330.
- Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull WHO* 1989; 67: 375-380.
- Guzmán MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernández A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *PAHO Bull* 1984; 18: 213-220.
- Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; 121: 102-110.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 158-165.
- Gobernación de Santander, Secretaría de Salud Departamental, Subdirección de Salud Pública. Plan de contingencia Fiebre Amarilla Santander, enero 2004. URL disponible en <http://www.salud>

- santander.gov.co
17. Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán M, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3508-3510.
 18. Burke D, Nisalak A, Ussery M. Antibody capture immunoassay detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 1034-1042.
 19. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock J. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 581-589.
 20. Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Gunarso S. Epidemic dengue 3 in Central Java, associated with low viremia in man. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30: 1094-1099.
 21. Kouri G, Guzmán MG, Valdés L, et al. Reemergence of dengue in Cuba: A 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 89-92.
 22. Travassos da RA, Vasconcelos P, Travassos da RE, et al. Dengue epidemic in Belem, Pará, Brazil, 1996-1997. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 298-301.
 23. Harris E, Videá E, Pérez L, et al. Clinical, epidemiological and virological features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 5-11.
 24. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 81: 2-9.
 25. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997; 176: 313-321.
 26. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 418-427.
 27. Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Shatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro. *Res Virol* 1992; 143: 423-427.
 28. Rigau JC, Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler DJ, Kuno G (eds.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 405-423.
 29. Rigau JC, Ayala A, García E, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 355-362.
 30. Fakeeh M, Zaki M. Virological and serological surveillance for dengue fever in Jeddah, Saudi Arabia, 1994-1999. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 764-767.
 31. Yamada KI, Takasaki T, Nawa M, Kurane I. Virus isolation as one of the diagnostic method for dengue virus infection. *J Clin Virol* 2002; 24: 203-209.
 32. Vaughan HE, George A, Morris-Glasgow V, Campione-Piccardo J. Molecular diagnosis of dengue by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *West Indian Med J* 1999; 48: 118-122.
 33. Yamada K, Nawa M, Takasaki T, Yabe S, Kurane I. Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn J Infect Dis* 1999; 4: 150-155.
 34. Balmaseda A, Sandoval E, Pérez L, Gutiérrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 6: 893-897.
 35. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of the infected patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1053-1057.