

# El diagnóstico del dengue en tiempos del zika



El dengue y el zika representan un problema de salud pública para los países tropicales y subtropicales. El diagnóstico oportuno y confiable de estas enfermedades es necesario para el tratamiento de los pacientes, la vigilancia epidemiológica y su control. Discutimos los diferentes métodos de diagnóstico, las dificultades que presentan por la reactividad cruzada entre estas enfermedades y algunos avances en el desarrollo de nuevos métodos.

## Introducción

Las infecciones virales transmitidas por mosquitos representan uno de los principales problemas de salud pública para aquellos países ubicados en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente se estima que más de 100 países son endémicos para dengue y cerca de  $2/3$  de la población mundial vive en zonas de riesgo para contraer dengue y zika (Guzmán y cols., 2010).

Los virus Dengue y Zika están clasificados dentro de la familia *Flaviviridae* y en el género *Flavivirus*. El virus tipo de esta familia es el de la Fiebre Amarilla, de donde toma su nombre este taxón (del latín *flavus*, que significa amarillo), pero también se encuentran clasificados en este grupo otros virus de importancia para la salud pública, como el virus de la encefalitis japonesa y el virus del Oeste del Nilo (Guzmán y cols., 2010). Todos éstos se transmiten a los seres humanos mediante las picaduras de mosquitos infectados (por lo que también se conocen como arbovirus, del inglés *arthropod-borne virus*), los cuales se infectan, a su vez, al picar a mamíferos infectados o que adquirieron el virus **transovarialmente** de la madre respectiva (Guzmán y cols. 2010). En el caso de los virus causantes de dengue y de zika, el ciclo de transmisión urbano involucra principalmente al mosquito *Aedes aegypti*, aunque la transmisión por *Aedes albopictus* también es posible (Guzmán y cols., 2010; Alcalá y cols., 2018).

### Transovarialmente

Trasmisión del dengue (y otros flavivirus) del mosquito hembra infectado a la progenie, a través de los huevos. ▶

Los síntomas del dengue, zika y chikungunya son parecidos. Si tienes:



**DOLOR DE CABEZA**



**NÁUSEAS O VÓMITOS**



**FATIGA**



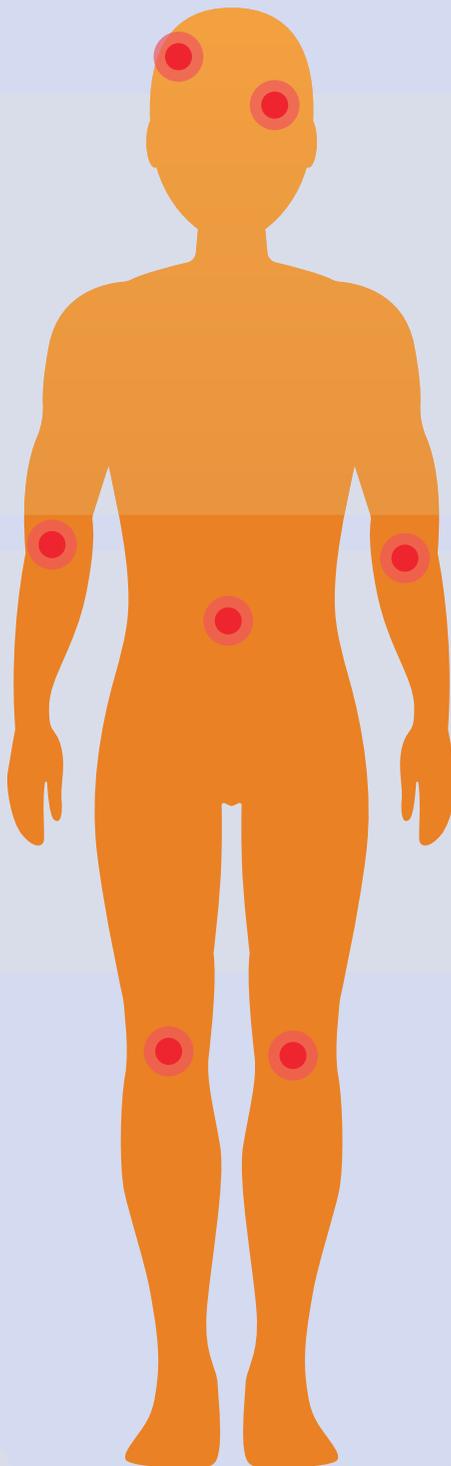
**FIEBRE ALTA O MODERADA**



**DOLOR MUSCULAR  
O DE ARTICULACIONES**



**ERUPCIONES  
EN LA PIEL**



No te automediques y acude a tu unidad de salud más cercana para consultar a un médico.



**Virión**

Forma extracelular e infecciosa de los virus. Está compuesto por el genoma viral (ARN o ADN) recubierto por proteínas virales y, en algunos casos, también presenta una bicapa lipídica.

El virus Dengue presenta un **virión** de unos 50 nm de diámetro aproximadamente, el cual está envuelto en una membrana lipídica y contiene el genoma viral; éste está compuesto por una molécula de ARN de cadena simple y de polaridad positiva. Una vez libre en el citoplasma de la célula infectada, el genoma viral codifica para 10 proteínas; 3 de éstas, llamadas C (cápside), prM (precursora de membrana) y E (envoltura), forman parte del virión, mientras que las otras 7 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) son proteínas no estructurales (NS), presentes en las células infectadas, pero que nunca pasan a formar parte de la partícula viral o virión. Una propiedad de la proteína NS1 es que es secretada eficientemente, junto con las partículas virales, de las células infectadas y circula en altos niveles en el suero de los pacientes durante la etapa aguda de la enfermedad (Alcalá y cols., 2018). El virus Zika presenta un virión y un genoma muy parecidos a los del virus Dengue; sin embargo, se ha demostrado que el primer virus también es transmitido sexualmente, lo cual nunca ha sido descrito para el segundo (Guzmán y cols., 2010).

**Curso clínico del dengue y del zika**

En su mayoría, las infecciones con el virus Dengue o con el virus Zika cursan de manera asintomática. Sin embargo, las infecciones de dengue pueden generar un espectro variado de cuadros clínicos, que van desde un cuadro febril leve (fiebre por dengue), pasando por un cuadro febril complicado (fiebre por dengue con síntomas de alarma), hasta un cuadro febril severo (dengue severo), que puede comprometer la vida del paciente (Guzmán y cols., 2010).

El virus Dengue se presenta en cuatro serotipos (o variantes antigénicas) distintos, llamados dengue 1, 2, 3 y 4; los distintos serotipos se originan por variaciones genéticas de la proteína E (Guzmán y cols., 2010). La infección con cualquiera de los cuatro se-

Normal



Microcefalia



rotipos puede causar dengue y producir inmunidad de por vida para el serotipo infectante. Sin embargo, como no existe protección cruzada entre los distintos serotipos, una persona puede infectarse con el virus causante del dengue más de una vez. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que las infecciones secundarias de dengue presentan un riesgo aumentado de evolucionar a dengue severo (Rey y cols., 2018).

Para el virus Zika no se conocen serotipos y se asume que una sola infección produce inmunidad de por vida (Aliota y cols., 2017). La infección por este virus suele causar un cuadro febril leve parecido a la fiebre por dengue, que incluye, además de la fiebre, exantema en la piel y dolores musculares y articulares. Sin embargo, la infección en adultos se ha asociado a cuadros de Guillain-Barré y a malformaciones congénitas severas en el feto, cuando la madre es infectada durante el embarazo (Aliota y cols., 2017).

La fase febril de la enfermedad del dengue, que suele durar entre 4 y 7 días, viene acompañada por la circulación del virus en la sangre del paciente (viremia). Además, de 1 a 3 días luego de la aparición de la fiebre, también se encuentra en la sangre la proteína NS1 soluble (antigenemia), la cual puede llegar a alcanzar concentraciones tan altas como 10 µg/ml; es decir, presenta concentraciones equiparables con algunas proteínas nativas del suero (Rastogi y cols., 2016). Sin embargo, tanto la viremia

como la antigenemia suelen ser de corta duración y desaparecer pocos días después de que se presente la fiebre (véase la Figura 1). Además, los niveles de viremia y de NS1 circulantes pueden variar dependiendo del serotipo del dengue infectante y entre infecciones primarias y secundarias (Rastogi y cols., 2016).

También, durante la infección por el virus Zika ocurre viremia y antigenemia de NS1 durante los primeros 7 días de síntomas. Sin embargo, al parecer, los niveles de virus y de NS1 reportados en suero son menores en comparación con dengue (Bosch y cols., 2017). No obstante, en el caso del virus Zika, el ARN viral puede ser detectado en otros fluidos corporales, como orina, semen, leche materna y saliva.

En respuesta a las infecciones virales, como parte de los mecanismos de defensa contra la infección, el huésped responde mediante la producción de anticuerpos o **inmunoglobulinas**. En el caso de las infecciones por el virus del dengue, aparecen primeramente en el suero de los pacientes inmunoglobulinas del tipo IgM e IgA (2 a 4 días luego de la fiebre) y, más tardíamente (6 a 7 días en adelante), la inmunoglobulina de tipo IgG. Sin embargo, en casos de dengue secundario, los niveles de IgG suelen aumentar muy rápidamente en suero luego de aparecer la fiebre (2 a 3 días) (Miagostovich y cols., 1999). Las inmunoglobulinas de tipo IgM e IgA suelen desaparecer unas 2 semanas después de que se presentan, mientras que los niveles de IgG pueden permanecer altos y detectables por meses (véase la Figura 1).

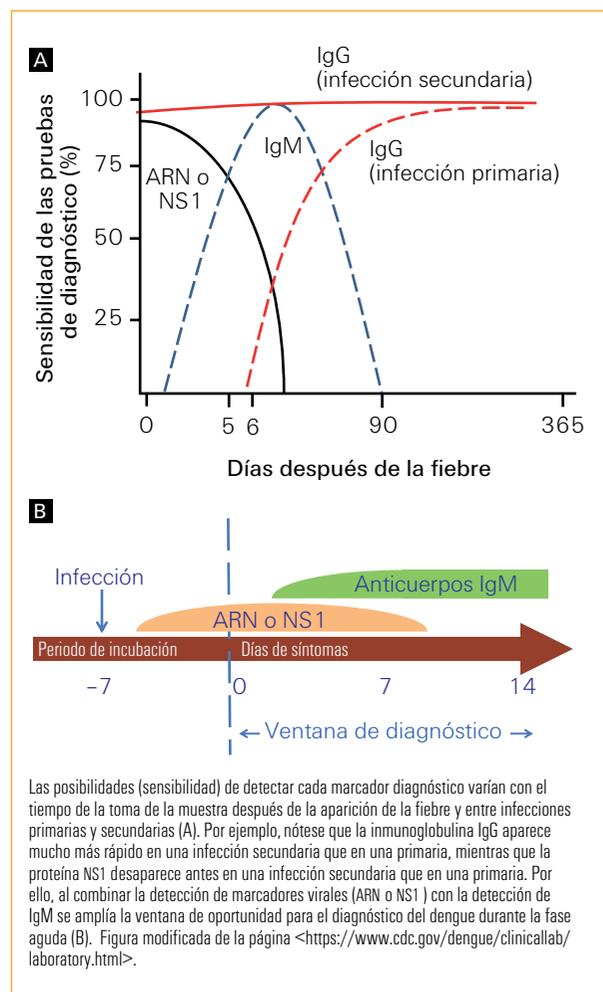
En vista de que los virus Dengue y Zika comparten el mismo ciclo de transmisión y la misma distribución epidemiológica, y dada la similitud entre ambos (Aliota y cols., 2017), existe gran interés por conocer si la exposición previa al virus del dengue puede modular la respuesta inmune contra la infección por el virus Zika, y viceversa. Sin embargo, los estudios hechos con modelos animales, que incluyen primates no humanos, así como los estudios epidemiológicos sugieren que el haber sufrido dengue no condiciona de manera significativa la respuesta inmune a infecciones posteriores por zika, ni la exposición previa a este último tiene al-

gún efecto para la infección por dengue (Sariol y cols., 2018).

### Diagnóstico del dengue y consideraciones en áreas de coendemicidad con el zika

Las infecciones virales se diagnostican básicamente de tres maneras: 1) detección del virus en el paciente; 2) detección de productos virales, como alguna proteína o el ácido nucleico viral, y 3) detección de productos que el huésped produce específicamente en respuesta a la infección viral, como las inmunoglobulinas, principalmente las de tipo IgM.

Determinar la causa de la infección en un paciente con síntomas de dengue puede orientar al



### Inmunoglobulinas

Proteínas producidas por los linfocitos, capaces de reconocer y unirse a antígenos (proteínas extrañas al cuerpo); pueden ser de varias clases: IgM, IgA, IgG e IgE.

**Figura 1.** Curso de los marcadores serológicos de la infección por dengue.



personal de asistencia médica a considerar la presencia de dengue en pacientes con enfermedad febril aguda y a prevenir o tratar el dengue severo. Por su parte, las pruebas confirmatorias en los laboratorios públicos de referencia ayudan a identificar casos, brotes o epidemias de dengue, para así poder implementar medidas de prevención y control. Para las personas con síntomas, es crucial conocer el día de inicio de éstos y el día de recolección de la muestra, ya que esta información ayuda a determinar qué pruebas deben correrse para aumentar las posibilidades de un diagnóstico certero (véase la Figura 1).

#### *Pruebas de detección de productos virales*

Los primeros 6 días después de iniciados los síntomas se denominan fase aguda del dengue. Durante este tiempo, el virus del dengue se encuentra presente en la sangre o en los fluidos derivados de la sangre, como el suero o el plasma. El ARN del virus del dengue puede detectarse mediante pruebas moleculares, como el RT-PCR (véase la Figura 1). Las pruebas actuales tienen una sensibilidad de 80-90% durante los primeros 3 días de la enfermedad, y una especificidad mayor de 95 por ciento.

La proteína no estructural NS1 también puede detectarse mediante algunas pruebas comerciales durante la fase aguda del dengue (Bosch y cols., 2017). Un resultado positivo de RT-PCR o NS1 se considera como concluyente, mientras que un resultado negativo no lo es. El uso de las pruebas moleculares o de detección de NS1, combinado con ELISA para detección de anticuerpos IgM en una sola muestra de suero tomada en los primeros 7 días de la enfermedad, permite determinar con precisión la infección por dengue en más de 95% de los casos (Hunsperger y cols., 2016). Determinar el serotipo del virus del dengue que está infectando no tiene consecuencias inmediatas para el cuidado del paciente, pero proporciona información valiosa para que los funcionarios de salud pública comprendan la epidemiología del dengue y diseñen estrategias de control. La mayoría de los laboratorios clínicos utiliza pruebas de RT-PCR para diferenciar los cuatro serotipos del virus del dengue.

#### *Pruebas de detección de anticuerpos*

Como parte de la respuesta del sistema inmune para combatir la infección, los anticuerpos IgM específicos para el virus del dengue aumentan después de unos días de la enfermedad y, por lo general, pueden ser detectados por una prueba de ELISA entre los 4 y 5 días después de la aparición de los síntomas y aproximadamente 12 semanas después de la infección son detectables con toda certeza (véase la Figura 1).

El periodo comprendido luego de los 7 días de aparición de los síntomas y hasta las 12 semanas después se considera como la fase convaleciente de la enfermedad. Se requiere una muestra de la fase convaleciente para el diagnóstico de la infección por el virus del dengue cuando los resultados obtenidos durante la fase aguda son negativos o si no se obtuvo dicha muestra. Durante la fase convaleciente, los anticuerpos IgM por lo general están presentes y pueden detectarse fácilmente con una prueba de ELISA. No obstante, la detección del anticuerpo IgM no es útil en la determinación del serotipo del dengue. Los casos de pacientes que presentan un cambio de resultados –seroconversión, de IgM negativos a positivos en muestras pareadas recogidas; la primera, antes o muy temprano en la enfermedad y, la segunda, después de que los síntomas disminuyen (típicamente separadas por 7 o más días)– se clasifican como infecciones de dengue en curso. Normalmente los anticuerpos IgM decaen luego de 12 semanas (véase la Figura 1).

Una limitación importante de las pruebas serológicas para dengue es la reactividad cruzada entre *Flavivirus* (véase la Tabla 1). Esta limitación debe tomarse en cuenta cuando se trabaje en áreas donde cocirculan múltiples virus de esta familia; por ejemplo, el virus Dengue y el virus Zika (Aliota y cols., 2017). En estos casos, un resultado de IgM positivo sólo se clasifica como una presunta infección reciente de dengue.

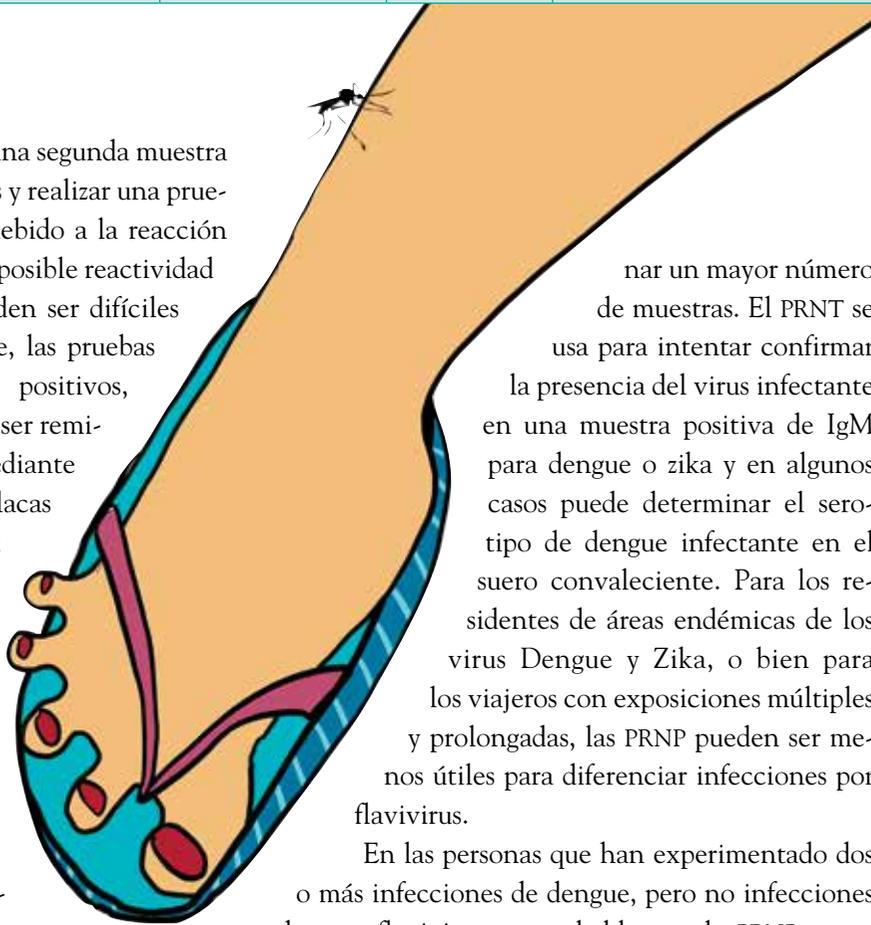
Los pacientes con resultados de IgM negativos antes del día 7 de la enfermedad y, además, con resultados negativos en pruebas de detección de ácidos nucleicos o NS1, o la ausencia de éstos, se consideran casos indeterminados (resultados no concluyen-

**Tabla 1.** Comparación de marcadores utilizados para el diagnóstico del dengue

Marcador diagnóstico	Técnica de detección	Muestra utilizada	Ventajas	Desventajas	Comentarios
Genoma viral (ARN)	RT-PCR	Sangre Suero Plasma Muestra de tejido	Alta sensibilidad y especificidad en fase temprana	Poca duración en sangre	Permite la identificación simultánea de serotipos
Proteína NS1	ELISA Inmunocromatografía*	Sangre Suero Plasma	Alta sensibilidad y especificidad en fase temprana	Poca duración en sangre	Sensibilidad puede variar entre infecciones primarias y secundarias
IgM específica	MAC-ELISA Inmunocromatografía*	Sangre Suero Plasma	Larga duración en sangre	Reactividad cruzada	Puede perdurar más allá de los síntomas clínicos
IgG específica	ELISA Inmunocromatografía*	Sangre Suero Plasma	Marcador de infecciones secundarias	Reactividad cruzada	No se utiliza para diagnosticar infecciones agudas

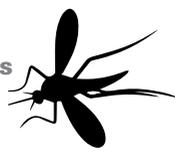
\* Pruebas rápidas en tiras de papel.

tes). Para éstos debe obtenerse una segunda muestra después del día 6 de los síntomas y realizar una prueba serológica adicional. Pero, debido a la reacción cruzada con otros flavivirus y la posible reactividad inespecífica, los resultados pueden ser difíciles de interpretar. Por consiguiente, las pruebas con resultados presuntamente positivos, ambiguos o inconclusos pueden ser remitidas para su confirmación mediante un ensayo de reducción de placas por neutralización (PRNT, del inglés *Plaque Reduction Neutralization Test*). El PRNT mide el título de los anticuerpos neutralizantes en el suero de la persona infectada y es un ensayo biológico *in vitro* basado en la interacción del virus con los anticuerpos del huésped que resulta en la inactivación del virus, de manera que ya no puede infectar el cultivo celular ni formar placas. El ensayo de microneutralización se basa en el mismo principio que PRNT; sin embargo, en lugar de contar el número de placas por pozo, el ensayo usa la medición colorimétrica o fluorométrica del número de células infectadas para determinar la dilución de punto final. Este ensayo se desarrolló para usar menos cantidad de reactivos y para exami-



nar un mayor número de muestras. El PRNT se usa para intentar confirmar la presencia del virus infectante en una muestra positiva de IgM para dengue o zika y en algunos casos puede determinar el serotipo de dengue infectante en el suero convaleciente. Para los residentes de áreas endémicas de los virus Dengue y Zika, o bien para los viajeros con exposiciones múltiples y prolongadas, las PRNP pueden ser menos útiles para diferenciar infecciones por flavivirus.

En las personas que han experimentado dos o más infecciones de dengue, pero no infecciones de otro flavivirus, es probable que la PRNP tenga un resultado positivo para más de un serotipo de dengue, y por lo tanto sea menos específica. En las personas que tienen un resultado de IgM positivo y hayan tenido una infección previa con otro flavivirus, la PRNP puede detectar anticuerpos para la infección reciente de dengue, como también anticuerpos para otras infecciones de flavivirus, y por lo tanto ser menos específica.



### Diagnóstico post mortem

El diagnóstico forense para dengue es importante para resolver casos fatales de enfermedad febril o de fiebre hemorrágica. Las muestras de sangre o suero pueden ser probadas por las técnicas moleculares y serológicas ya descritas (véase la Tabla 1). Existen también pruebas de tejido para el virus Dengue que pueden realizarse en muestras de autopsias, como RT-PCR y el análisis inmunohistoquímico (IHQ). Ambas técnicas usan tejidos fijados en formalina, lo cual simplifica el transporte de las muestras, permite realizar estudios retrospectivos y minimiza la exposición de los trabajadores de los laboratorios a los agentes infecciosos. Los tejidos de hígado, riñón, bazo y pulmón son óptimos para el diagnóstico del virus del dengue. Un resultado positivo de RT-PCR o IHQ confirma la presencia del virus del dengue en el tejido. Sin embargo, pueden tomarse en cuenta otras causas de muerte. Un resultado negativo no excluye la presencia de una infección. En el contexto de los hallazgos histopatológicos se interpreta la historia clínica y epidemiológica, así como otros exámenes de laboratorio.

### ■ Reactividad cruzada con zika

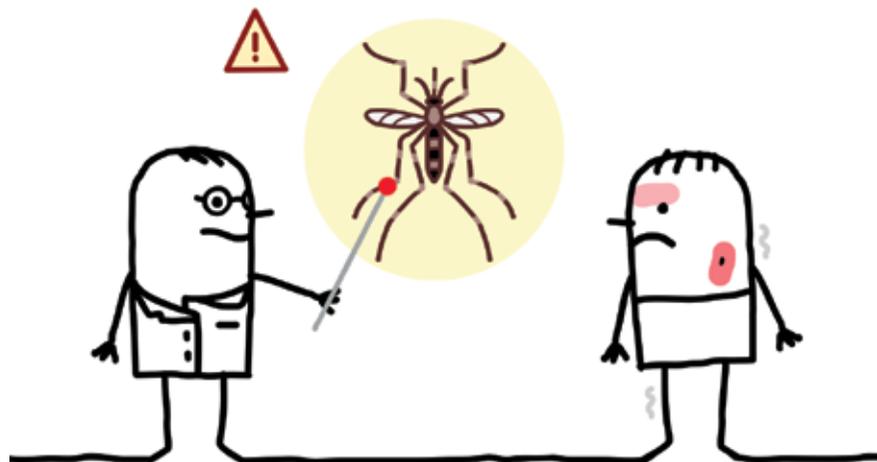
■ En años recientes, el surgimiento y la expansión de la transmisión del virus Zika en territorios previamente endémicos para Dengue han generado un reto para el diagnóstico de las dos enfermedades que provocan. Si la prueba RT-PCR es positiva para dengue, se confirma el diagnóstico de dengue en curso, pero

si el resultado es negativo y el ELISA de IgM es positivo, entonces el caso se considera sólo presuntamente positivo para dengue, ya que existe la posibilidad de que haya otros flavivirus, como Zika, la Fiebre Amarilla, la encefalitis japonesa, el virus del Oeste del Nilo y el de la encefalitis de San Luis circulando en la región donde probablemente se infectó el paciente. En dichos casos, y dependiendo del contexto epidemiológico y la capacidad del laboratorio, puede ser recomendable hacer una PRNT para intentar establecer cuál es el virus causante de la infección.

Sin embargo, una de las grandes necesidades actuales es poder diagnosticar infecciones pasadas con los virus Dengue o Zika, sobre todo en el contexto de mujeres embarazadas o con deseos de embarazarse que presenten cuadros febriles en zonas endémicas. Este tipo de diagnóstico se ha visto dificultado por la alta reactividad cruzada que se ha observado entre los virus Dengue y Zika en pruebas serológicas que detectan IgM o IgG. Por lo tanto, se hacen necesarios estudios serológicos de alta resolución, tal vez ya no basados en la respuesta a la proteína E del virus, sino a otras, como NS1 o alguna otra proteína estructural o no estructural, que permitan identificar claramente el estatus inmunológico de las personas, en especial mujeres, que viven en zonas de riesgo para estas y otras arbovirosis.

### ■ El futuro del diagnóstico del dengue

■ Si bien en la actualidad el diagnóstico de los casos agudos de dengue o zika puede hacerse con niveles



aceptables de sensibilidad y especificidad, existe aún campo para introducir mejoras en los métodos de diagnóstico viral. Además, es necesario distinguir con claridad entre infecciones pasadas con el virus Dengue o Zika.

Entre otras, las mejoras en los métodos de diagnóstico estarían dirigidas a: 1) detectar virus en muestras humanas obtenidas por métodos no invasivos que no dependan de agujas hipodérmicas, como muestras de saliva u orina; 2) simplificar los métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras recolectadas, más independientes de equipos; 3) desarrollar técnicas aplicables en campo o en hospitales (al pie del paciente), con reactivos y componentes que sean termoestables; 4) permitir la lectura automatizada de los resultados y su envío remoto a centros de salud y autoridades de salud pública, y, naturalmente, 5) mejorar la sensibilidad, la especificidad y los costos. En este sentido, la aplicación de las técnicas de CRISPR/Cas al diagnóstico ha permitido tener un aumento en la sensibilidad hasta concentraciones de atomolar (aM), al menos 100 veces más sensible que una prueba de PCR, así como la inmovilización de reactivos sobre tiras de papel, que permite su transporte a campo (Myhrvold y cols., 2018).

## Comentarios finales

■ Contar con métodos de diagnóstico capaces de detectar infecciones presentes y pasadas con el virus Dengue y con el virus Zika de manera confiable y oportuna es fundamental para poder asistir a los pacientes y para controlar las enfermedades que provocan. En la actualidad se tienen métodos robustos basados en la detección del ARN viral o de la proteína NS1 capaces de diagnosticar de manera confiable el dengue y el zika en su etapa aguda. Más aún, algunos de estos métodos se han adaptado a pruebas rápidas, simples y confiables que pueden ser utilizadas al lado del paciente (*point-of-care*) o en campo.

### Jorge L. Muñoz Jordán

Molecular Diagnostic Laboratory, Dengue Branch, Centers for Disease Control and Prevention, San Juan, Puerto Rico. ckq2@cdc.gov

### Juan Ernesto Ludert

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. jludert@cinvestav.mx

### Referencias específicas

- Alcalá, A. C., L. A. Palomares y J. E. Ludert (2018), "Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations", *J Virol*, 92(14):e00275-18. doi: 10.1128/JVI.00275-18
- Aliota, M. T. *et al.* (2017), "Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network", *Antiviral Res*, 144:223-246. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.06.001
- Bosch, I. *et al.* (2017), "Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum", *Sci Transl Med*, 9(409):eaan1589. doi: 10.1126/scitranslmed.aan1589
- Guzmán, M. G. *et al.* (2010), "Dengue: a continuing global threat", *Nat Rev Microbiol*, 8(12 Suppl):S7-16. doi: 10.1038/nrmicro2460
- Hunsperger, E. A. *et al.* (2016), "Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm", *J Infect Dis*, 214(6):836-844. doi: 10.1093/infdis/jiw103
- Miagostovich, M. P. *et al.* (1999), "Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis", *J Clin Virol*, 14(3):183-189.
- Myhrvold, C. *et al.* (2018), "Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13", *Science*, 36(6387):444-448. doi: 10.1126/science.aas8836
- Rastogi, M., N. Sharma y S. K. (2016), "Singh Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein", *Virol J*, 13:131. doi: 10.1186/s12985-016-0590-7
- Rey, F. A. *et al.* (2018), "The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design", *EMBO Rep*, 19(2):206-224. doi: 10.15252/embr.201745302
- Sariol, C. A., M. L. Nogueira y N. Vasilakis (2018), "A Tale of Two Viruses: Does Heterologous Flavivirus Immunity Enhance Zika Disease?", *Trends Microbiol*, 26(3):186-190. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.004