

EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LA DETECCIÓN DE NS1 EN PACIENTES CON DENGUE AGUDO¹

DIAGNOSTIC VALUE OF NS1 DETECTION IN SERUM FROM ACUTE DENGUE PATIENTS

² Jeanette Prada-Arismendy.

³ Jenniffer A. Buitrago.

⁴ Jéssica Beltrán.

⁵ Olga Lucía Chavarro.

⁶ Jaime E. Castellanos.

Resumen

El dengue es endemo-epidémico en Colombia y gran parte de nuestra población está en riesgo de padecer esta enfermedad. Uno de los principales problemas en el manejo del dengue es la dificultad para diagnosticar tempranamente esta arbovirosis, ya que la enfermedad presenta un cuadro clínico de evolución inespecífica, por lo cual es indispensable contar con herramientas diagnósticas rápidas y efectivas.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el valor diagnóstico de la detección de la proteína viral NS1 en pacientes con sospecha de dengue agudo, provenientes del Departamento de Cundinamarca, a quienes previamente se les había realizado detección de IgM en el Laboratorio de Salud Pública de Cundinamarca; de éstos, 44 muestras correspondían a pacientes con una prueba IgM positiva y las otras 44 a pacientes con una prueba de IgM negativa para dengue.

A todas las muestras de suero se les practicó la prueba mediante el sistema Pan-E Dengue Early ELISA™ (Panbio) para la detección de NS1. Al hacer el análisis estadístico, se

Abstract

Dengue is an endemic disease in Colombia and a large part of our population is at risk of suffering from this illness. One of the main problems in the management of dengue is the difficulty to do an appropriate and early diagnosis, because the disease presents an inespecific evolution, thus, it is essential to account on fast and effective diagnostic tools.

The present work aimed to evaluate the diagnostic value of detection of the viral protein NS1 in patients with suspected acute dengue, from the Department de Cundinamarca, who had previously been submitted to IgM detection in the Cundinamarca Public Health Laboratory; 44 samples came from patients with a positive IgM test and the other 44 to patients with negative IgM for dengue virus.

All serum samples were submitted to Pan Dengue Early ELISA™ (Panbio) system for NS1 detection.

The statistical analysis showed a moderate concordance between the two diagnostic tests. We also found that 40% of positive samples for NS1 had previously been reported as negative according to the results of IgM. Simi-

Recibido el 15/03/2012

Aprobado 06/06/2012

1. Artículo original.

2. MD, MSc. Instituto de Virología, Universidad El Bosque.

3. BLC. Instituto de Virología, Universidad El Bosque

4. Laboratorio de Salud Pública, Secretaría de Salud de Cundinamarca.

5. BLC. Laboratorio de Salud Pública, Secretaría de Salud de Cundinamarca.

6. OD, MSc, PhD. Instituto de Virología, Universidad El Bosque castellanosjaime@unbosque.edu.co

obtuvo una concordancia moderada entre las dos pruebas diagnósticas. Además, se encontró que 40 % de las muestras positivas para NS1, habían sido previamente reportadas como negativas de acuerdo con el resultado de IgM. De igual forma, se encontró enfermedad grave a menor edad y diferencias significativas en la presencia de erupción cutánea, ausencia de diarrea, leucocitos de menos de 4.000 células/ μ l y menos de 180.000 plaquetas/ μ l, al comparar los resultados positivos y negativos de cada prueba.

Se puede concluir que la determinación de NS1 es necesaria en los casos sospechosos de dengue agudo y, junto con la determinación de IgM, representa un complemento eficiente para el diagnóstico, agilizando la instauración de un tratamiento oportuno.

Palabras clave: dengue, ELISA, proteína NS1, IgM.

INTRODUCCIÓN

Colombia se ha convertido en un país endémico para dengue, no sólo debido a su ubicación geográfica, sino también por diversos factores socio-demográficos, lo que se ha visto reflejado en un aumento del número de casos notificados en los últimos años. Según el Instituto Nacional de Salud, durante la epidemia de 2010 se presentaron 147.670 casos de dengue y 9.482 casos de dengue grave con una letalidad de 2,28 %. En el 2011, a pesar de que el número de casos fue significativamente menor (31.372 casos de dengue y 1.383 casos de dengue grave), la letalidad estuvo en aumento con un índice de 3,04 %. Hasta febrero de 2012 ya se habían notificado 2.202 casos de dengue, de los cuales, 89 eran de dengue grave, y el canal endémico se encontraba en zona de alerta (1-4).

La Organización Mundial de la Salud modificó recientemente la forma de clasificar la enfermedad en dos grandes grupos (2): el primero, denominado dengue no grave, puede cursar con signos de alarma o sin ellos, y el segundo, conocido como dengue grave, se acompaña de signos de extravasación de plasma, hemorragia grave y afección orgánica.

En todos los casos, el cuadro clínico se inicia después de un periodo de incubación aproximado de 3 a 10 días, tras lo cual se identifican tres fases. La primera es la aguda, con fiebre de 2 a 7 días, en la cual se observa enrojecimiento facial, eritema cutáneo, mialgias, artralgias, cefalea, anorexia, náuseas y vómito. En algunos de estos casos se puede evidenciar un descenso de la fiebre o normalización de la temperatura corporal con recuperación clínica.

larly, it was found that as younger age, severe disease was present, there were found significant differences in the presence of rash, absence of diarrhea, leukocytes <4000 cel/ μ l and platelets $<180,000/\mu$ l when comparing positive and negative results of each test.

We can conclude that NS1 determination is needed in suspected cases of acute dengue, and in conjunction with the determination of IgM represents an efficient complement to diagnosis, thus expediting the implementation of early treatment.

Key words: dengue, ELISA, NS1 protein, IgM.

En otras ocasiones, entre el tercero y séptimo día de evolución, se presentan signos de alarma, como dolor abdominal intenso, vómito persistente, acumulación de líquidos, hemorragia activa en mucosas, hepatomegalia, aumento del hematocrito y disminución del recuento plaquetario, que orientan la enfermedad hacia una fase crítica que puede durar de 24 a 48 horas y se caracteriza por aumento de la permeabilidad capilar con extravasación variable de plasma, con un consecuente aumento del hematocrito y disminución de las plaquetas; según la disminución del volumen plasmático, se puede presentar choque, con hipotensión, hipoperfusión, disfunción orgánica progresiva, acidosis metabólica, coagulación intravascular diseminada y hemorragia grave. En esta fase se debe implementar una serie de medidas de soporte para tratar de estabilizar al paciente; si éste responde, entra en fase de recuperación con reabsorción progresiva del líquido extravascular, pero, si la enfermedad progresa, puede ser fatal (2,5,6).

La clasificación anterior de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue, fue de gran ayuda para la estratificación clínica. Sin embargo, frecuentemente se observan casos que no cumplen estos criterios y presentan síntomas inusuales que dificultan el diagnóstico oportuno (7), por lo que se requieren pruebas estandarizadas de diagnóstico temprano que permitan un tratamiento adecuado con la consecuente reducción de morbilidad y mortalidad por dengue.

El diagnóstico de la enfermedad puede basarse en la detección de virus durante la fase aguda, que va del día cero hasta el cuarto o quinto día de enfermedad, en muestras de suero, plasma, células sanguíneas o

tejidos. Esto se hace mediante técnicas para aislamiento viral, detección de ARN viral o antígenos, como la proteína viral no estructural NS1. Por otro lado, la serología es el método de elección al final de la fase aguda o en la fase de convalecencia, debido a que la producción de anticuerpos varía según el sistema inmunitario del huésped y si se trata de una primoinfección o de una reinfección con un serotipo heterólogo (3,8). En caso de una primoinfección, se desarrolla una respuesta primaria con aparición lenta de IgM. Estos anticuerpos se detectan, aproximadamente, en 50 % de los pacientes entre tres y cinco días después del inicio de la enfermedad, aumenta a 80 % hacia el quinto día y, en 99 %, hacia el décimo día de iniciada la fiebre, para descender a niveles indetectables al tercer mes después de la infección.

Por otro lado, cuando se trata de una infección secundaria o en caso de vacunación previa contra fiebre amarilla, los niveles de IgM no son tan elevados como en una infección primaria y pueden ser indetectables (9,10).

Actualmente, el Instituto Nacional de Salud realiza tres pruebas dentro del programa de vigilancia de dengue: aislamiento viral en células de mosquito, amplificación molecular mediante RT-PCR y detección de anticuerpos IgM específicos contra el virus (11). Aunque las dos primeras son muy específicas y útiles dentro de los primeros cinco días de la infección, son dispendiosas, de alto costo, y requieren equipo especializado y personal profesional entrenado (12). La detección de anticuerpos IgM es la prueba más utilizada por su rapidez y economía. Si éstos se detectan en una única muestra entre el quinto y el décimo día de la enfermedad, se considera un caso probable pero, para confirmar el diagnóstico, es necesario encontrar un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos IgM en una segunda muestra tomada 7 a 10 días después de la primera (2,7,12). Por estas características en la evolución de la enfermedad, la mayoría de los casos sólo se confirman al final de la fase crítica, momento en que el paciente ya ha sufrido las complicaciones propias de la infección, o en que ya ha sido dado de alta.

Todo esto ha generado la necesidad de estandarizar una prueba que sea de fácil y rápida ejecución, con resultados sensibles y específicos en los primeros días de la enfermedad, durante la fase febril, cuando los síntomas son inespecíficos, lo cual permite un diagnóstico diferencial con otras enfermedades que cursan también con fiebre temprana, para establecer pautas de manejo que eviten las complicaciones o la muerte (2,12).

La detección de la proteína viral NS1 podría solucionar parte del problema en el diagnóstico de dengue. Esta proteína viral es una glucoproteína de 48 kDa, sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso de las células infectadas en forma de monómero y que posteriormente se dimeriza para asociarse a balsas lipídicas (*rafts*) de la membrana plasmática o estar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular, lo que induce la estimulación del sistema inmunitario (13). Sus funciones no están bien determinadas, aunque se cree que está implicada en la replicación temprana, la morfogénesis viral y en la respuesta inmunitaria específica de serotipo. Además, se ha podido establecer una relación de los niveles altos de proteína NS1 en el suero de pacientes en fase aguda con la evolución de las formas graves de la enfermedad (8,13,15).

En la actualidad, existen kits comerciales basados en la técnica ELISA para la detección de la proteína NS1, fáciles de utilizar, con equipos comunes y resultados rápidos, que permiten confirmar la infección en suero o plasma, incluso durante los tres primeros días de iniciada la fiebre, periodo en el cual la prueba tiene una sensibilidad que oscila entre 64 y 100 % y una especificidad de 100 %. En este mismo periodo, la prueba ELISA para IgM específica tiene una sensibilidad entre 0 y 50 % (2,12,16). Esto hace que la detección de NS1 sea una alternativa que podría confirmar o descartar de manera rápida y oportuna el diagnóstico de dengue y, de esta forma, ayudar a iniciar un tratamiento más apropiado para el paciente (17).

Esta prueba ELISA para NS1 ha sido evaluada en diferentes poblaciones de América y el mundo. Por ejemplo, en Brasil se encontró una sensibilidad de 95,5 % y una especificidad de 81,1 %, resultados similares a los reportados por Guzmán, *et al.* (16), en muestras de pacientes provenientes de Tailandia, Filipinas, Vietnam, Malasia, Nicaragua y Venezuela, quienes notificaron una sensibilidad de 66 % y una especificidad de 100 %; en la India, en diferentes estudios, se obtuvieron valores entre 71,4 % y 100 % (12,18,19).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el valor diagnóstico de la detección de la proteína viral NS1 en pacientes con diagnóstico probable de dengue agudo, en comparación con la determinación de anticuerpos IgM por MAC-ELISA. Los resultados presentados permiten proponer preliminarmente la técnica ELISA para NS1 como una alternativa de diagnóstico temprano y moderadamente económico que brinda la oportunidad de mejorar el diagnóstico de dengue en casos de fiebres indiferenciadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación, población y muestra

El actual trabajo es un estudio preliminar exploratorio de tipo transversal, que se propone detectar la proteína no estructural NS1 del virus del dengue mediante el uso del kit comercial Pan-E (PanBio E-DEN01P™) en el suero de pacientes con sospecha de dengue agudo, que cuentan con una prueba previa ELISA para IgM específica para dengue, realizada en el Laboratorio de Salud Pública de Cundinamarca entre enero y agosto de 2010. Las muestras pertenecían a 88 pacientes, 50 % hombres y 50 % mujeres; 44 de ellas tenían una IgM positiva y 44 una IgM negativa, con edades que oscilaban entre los 6 meses y los 97 años de edad, procedentes de los municipios de Apulo, Caparrapí, Facatativá, Girardot, Guaduas, La Vega, Quebradanegra, Sibaté, Tocaima y Villeta, del departamento de Cundinamarca.

Recolección y análisis de datos

Se creó una base de datos en Excel 2007® con la información de las fichas clínicas de todos los pacientes. Las muestras fueron pareadas por edad y lugar de procedencia con el fin de hacer una comparación clínica. Como criterio de inclusión se buscaron las fichas clínicas con mayor cantidad de datos: edad, sexo, fecha de consulta, condición final, síntomas clínicos, recuento de leucocitos, hematocrito y plaquetas.

Para el análisis estadístico, se empleó el programa estadístico SPSS™, versión 19 para el procesamiento de los datos, en el cual se realizó una prueba t de Student para muestras independientes, comparando el recuento leucocitario, el recuento plaquetario y el porcentaje de hematocrito. Las muestras se agruparon según el resultado negativo o positivo para dengue por cada una de las técnicas. Además, se determinó la relación o independencia entre los signos y síntomas respecto al diagnóstico positivo o negativo en cada prueba diagnóstica (ji al cuadrado) usando EpiInfo™. Finalmente, se utilizó el programa Epidat™, 4.0, con el fin de establecer el índice kappa para determinar la concordancia entre las dos pruebas.

ELISA para NS1

El sistema empleado fue el Pan-E Dengue Early ELISA™ (Panbio), que es un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich sobre microplaca sensibilizada con anti-NS1. Las muestras de suero fueron diluidas a la mitad y se pusieron simultáneamente con los controles negativos y positivos por triplicado; se

incubó por una hora a 37 °C y, pasado este tiempo, se hicieron los lavados correspondientes.

Después de esto, se adicionaron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-NS1 conjugado con peroxidasa de rábano en cada pozo, se incubó por una hora a 37 °C, tras lo cual se hicieron los respectivos lavados y se adicionaron 100 µl de tetrametilbencidina por 10 minutos y, posteriormente, se añadieron 100 µl de solución de parada.

Finalmente, se hizo una lectura de absorbancias a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 630 nm. Con el promedio del valor de absorbancia de los calibradores, se calcularon el punto de corte y el valor índice (absorbancia de la muestra/punto de corte), los que indicaron reacción positiva o negativa para NS1.

Detección de IgM

Se utilizó el kit Dengue IgM Capture ELISA™ (MAC-ELISA) de Panbio (Cat N° E-DEN01M/E-DEN01M05), que es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, donde se empleó una microplaca sensibilizada con un anticuerpo específico anti-IgM humano que reacciona con los anticuerpos de tipo IgM presentes en el suero del paciente y, posteriormente, con un antígeno de dengue recombinante obtenido a partir de células de mosquito. Este complejo anticuerpo anti-IgM, IgM del paciente y antígeno recombinante, reacciona con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno viral marcado con peroxidasa que oxida al sustrato y el cromógeno, lo cual se evidencia con el cambio de color.

Resultados

De acuerdo con los resultados obtenidos por ambas técnicas, se dividieron las muestras en tres grupos.

En el primero, se incluyeron 38 pacientes, cuyos sueros resultaron positivos para la prueba ELISA para NS1, los cuales se consideraron casos confirmados de dengue agudo. Cabe resaltar que 15 de estos 38 sueros habían resultado previamente negativos en la prueba ELISA para IgM. En este primer grupo se logró determinar que 14 de estos 15 pacientes que resultaron falsos negativos en la prueba de IgM, habían consultado antes del cuarto día de iniciada la fiebre, periodo en el cual la inmunoglobulina aún no se detecta en el suero de pacientes con dengue agudo (tabla 1).

Día de consulta desde el inicio de la fiebre	Número de pacientes	Porcentaje de pacientes	Porcentaje acumulado de pacientes
1	1	6,7	6,7
2	2	13,3	20
3	7	46,7	66,7
4	4	26,7	93,3
5	1	6,7	100
Total	15	100	

Tabla 1. Día de consulta de los pacientes cuya muestra resultó positiva para NS1, y que habían resultado previamente negativos en la prueba de ELISA para IgM

En el segundo grupo, se incluyeron 28 pacientes con síndrome febril agudo de etiología desconocida, en los que se descartó el diagnóstico de dengue, ya que se obtuvieron resultados negativos tanto en la prueba ELISA para NS1 como en la ELISA para IgM. En el tercer grupo se incluyeron los pacientes con diagnóstico indefinido, equivalente a 22 muestras que resultaron negativas para NS1 pero positivas por ELISA para IgM. Este resultado no permite hacer una confirmación del diagnóstico de dengue, ya que para ello se requeriría el resultado de una muestra de fase convaleciente que corroborara una posible seroconversión (figura 1).

	IgM positiva	IgM negativa
NS1 positiva	22 (25%)	15 (17%)
NS1 negativa	22 (25%)	28 (32%)

A.

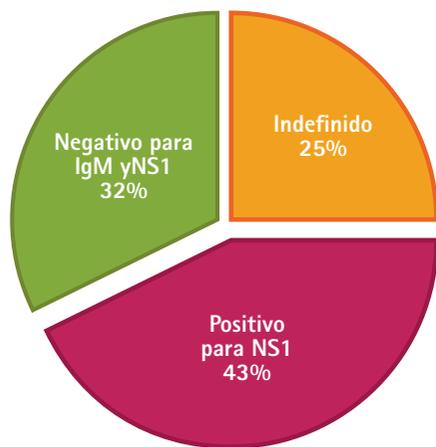


FIGURA 1. A. Resultados de las pruebas de ELISA para NS1 e IgM específica de dengue. B. Agrupación de resultados de acuerdo a la confirmación o no del diagnóstico de dengue agudo.

La detección de IgM por MAC-ELISA es la prueba más comúnmente utilizada para el diagnóstico de dengue en países endémicos para esta enfermedad. En la tabla 2 se presenta el resultado de la detección de NS1 en relación con el resultado previo de IgM y, también, según el día en que se tomó la muestra. En esta tabla se confirma que el mayor porcentaje de pruebas NS1 positivas se encuentran cuando la muestra se toma antes del quinto día de la enfermedad (40 a 55 %), mientras que la prueba de IgM presentó los mayores porcentajes de resultado positivo en las muestras tomadas después del quinto día de la enfermedad (54 a 80 %).

SIGNOS Y SÍNTOMAS RELACIONADOS CON EL DIAGNÓSTICO DE DENGUE

Se encontró una asociación significativa entre los signos de extravasación y la aparición de erupción cutánea, con la prueba positiva para IgM (χ^2 , $p < 0,05$). La ausencia de diarrea se correlacionó con el resultado positivo en la prueba para NS1 ($p < 0,045$). Los demás signos y síntomas reportados por los pacientes no se correlacionaron con el resultado de ninguna de las dos pruebas diagnósticas, demostrándose así que es imposible establecer el diagnóstico únicamente por la clínica debido al amplio número de entidades febriles con sintomatología similar (tabla 3).

Es de resaltar que en el grupo de 0 a 10 años se observaron signos de hemorragia en 50 % de los pacientes y, vómito, en 40 %. En los demás grupos de pacientes (mayores de 11 años), más de 50 % presentaron mialgias, artralgias, cefalea y dolor retroorbitario. Específicamente, en los grupos de 11 a 20 años y de 20 a 30 años, se presentó dolor abdominal en 57,1 % y, en 50% del grupo de más de 30 años, vómito. En resumen, la mayoría de los pacientes menores de 10 años presentó signos de alarma y los casos de 11 a

Días inicio de síntomas	Total muestras	IgM + (%)	IgM + / NS1 + (%)	IgM -	IgM - / NS1 + (%)	% Total NS1+	IgM + o NS1+ (%)
1	9	4 (44,4)	3 (75,0)	5	1 (20,0)	44,4	5 (55,6)
2	15	7 (46,7)	4 (57,1)	8	2 (25,0)	40,0	9 (60,0)
3	18	8 (44,4)	3 (37,5)	10	7 (70,0)	55,6	15 (83,3)
4	15	5 (33,3)	3 (60,0)	10	4 (40,0)	46,7	9 (60,0)
5	11	6 (54,5)	2 (33,3)	5	1 (20,0)	27,3	7 (63,6)
6	8	6 (75,0)	4 (66,7)	2	0 (0,0)	50,0	6 (75,0)
7	6	4 (66,7)	1 (25,0)	2	0 (0,0)	16,7	4 (66,7)
>7 días	5	4 (80,0)	2 (50,0)	2	0 (0,0)	22,2	4 (44,4)
Total	87	44 (48,4)	22 (50,0)	44	15 (34,1)	40,7	59 (64,8)

Tabla 2. Resultados de la prueba de detección de NS1 en relación al resultado de la ELISA para IgM y el día de la enfermedad.

	IgM (n=88)		NS1 (n=87)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Fiebre	93,2	97,7	94,7	50,0
Cefalea	47,7	54,5	50,0	53,1
Dolor retroorbital	27,3	34,1	39,5	24,5
Artralgias	50,0	52,3	55,3	49,0
Mialgias	68,2	70,5	65,8	71,4
Rash	22,7*	6,8*	21,1	10,2
Emesis	38,6	27,3	36,8	30,6
Ausencia de diarrea	6,8	0,0	7,9*	0,0*
Dolor abdominal	36,4	36,4	42,1	32,7
Dolor en hipocondrio derecho	15,9	9,1	7,9	16,3
Signos de hemorragia	40,9	25,0	34,2	30,6
Signos de extravasación	13,6*	2,3*	10,5	6,1

Tabla 3. Porcentaje de pacientes con los signos y síntomas señalados de acuerdo al resultado de los ensayos de ELISA para IgM y NS1, Con un asterisco se resaltan los datos clínicos en que la prueba χ^2 fue estadísticamente significativa al comparar los resultados positivos contra los negativos de cada técnica, * $p < 0,05$,

30 años presentaron signos y síntomas de un caso probable de dengue sin signos de alarma, evidenciándose mayor gravedad a menor edad (tabla 4).

Se estableció que los pacientes positivos para NS1 presentaron leucopenia ligera, en comparación con los que fueron negativos para NS1 ($p < 0,05$). De igual forma, los pacientes que resultaron positivos en la

prueba ELISA para IgM específica de dengue, presentaron trombocitopenia, en comparación con los pacientes que tuvieron una IgM negativa (tabla 5).

DISCUSIÓN

Entre los criterios de laboratorio para la confirmación de un caso probable de dengue, se contemplan dos

Edad (en años)	Dengue agudo confirmado		Negativo para dengue agudo	
0 a 10	50,0	Signos de hemorragia	42,9	Dolor abdominal y signos de hemorragia
	40,0	Emesis		
11 a 20	85,7	Artralgias	65,2	Mialgias
	71,4	Cefalea y mialgias		
21 a 30	85,7	Mialgias	75,0	Mialgias
	71,4	Cefalea y artralgias		
	57,1	Dolor abdominal		
Mayor a 30	78,6	Mialgias	88,9	Mialgias
	71,4	Artralgias		
	57,1	Dolor retro-orbital		
	50,0	Cefalea y emesis		

Tabla 4, Porcentaje de pacientes con los principales signos y síntomas según rangos de edad y de acuerdo al diagnóstico

	IgM (n:88)		NS1 (n:87)φ	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Leucocitos/μl	5,634	5,416	4,578*	6,127*
Plaquetas x 103	96,773**	164,147**	143,178	118,545
Hematocrito (%) Mujeres	39,1	34,4	39,3	36,1
Hombres	40,4	36,8	39,7	36,8

Tabla 5, Valor medio de leucocitos, plaquetas y hematocrito de acuerdo al resultado de los ensayos de ELISA para IgM y NS1. Se compararon los resultados positivos contra los negativos de cada técnica, t Student: *p<0,05, ** p<0,01,φ. Se excluyó del análisis una muestra por resultado dudoso

opciones: las pruebas virológicas o la identificación de anticuerpos específicos. La detección de IgM se debe practicar, según las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud, por dos métodos alternativos: la primera es la determinación de anticuerpos IgM mediante ELISA de captura (MAC-ELISA™, PanBio) o por un ensayo de Ultra Micro-ELISA® (UM-ELISA, Tecnosuma) en una única muestra de suero tomada después del quinto día de iniciados los síntomas. La segunda opción es utilizar la técnica de inhibición de la hemaglutinación para detectar anticuerpos IgM o IgG, comparando los títulos de una muestra tomada en fase aguda y los de otra en convalecencia (11,20), aunque esta técnica es más costosa y de difícil ejecución.

Este protocolo guía la tarea de diagnóstico y vigilancia realizada por los laboratorios colombianos de salud pública en el control del dengue, permitiendo

la utilización de la detección de anticuerpos IgM por la técnica MAC-ELISA como método principal de diagnóstico, teniendo en cuenta su bajo costo y la simplicidad de su ejecución.

Sin embargo, hay que considerar las limitaciones que presenta, como la baja sensibilidad en la detección de anticuerpos entre el primero y el cuarto día de enfermedad. Si bien es cierto que después del quinto día de haberse iniciado la fiebre se logran detectar las IgM en la mayoría de los pacientes, se debe tener en cuenta que sólo es 100 % sensible al final de la fase febril y durante la fase de crítica, lo cual retarda el inicio del tratamiento de la enfermedad y, por ende, aumenta la tasa de morbimortalidad.

El principal problema de usar la detección de IgM en el diagnóstico de dengue es que la detección de anti-

cuerpos en una única muestra sólo permite definir un caso de infección reciente, pero no un caso de dengue agudo (2,5,8,21). En este trabajo se encontró que, de 38 muestras positivas por ELISA para NS1, 15 habían resultado previamente negativas para IgM, lo que corresponde a 40 % de falsos negativos por la técnica ELISA para IgM. De estos pacientes, el 93,3 % había consultado entre el primero y el cuarto día del inicio de la fiebre, lo que podría explicar este alto porcentaje de falsos negativos, y demuestra que no se está cumpliendo con las recomendaciones establecidas para el manejo y diagnóstico del dengue, pues se recomienda hacer la prueba en muestras de los casos que presenten cuadro febril con más de cinco días de evolución (20).

Previamente se reportó, en un estudio en la India (12), 65,4 % de falsos negativos en la prueba ELISA para IgM específica de dengue, los cuales sí fueron detectados por ELISA para NS1 dentro de los primeros tres días del inicio de la fiebre. Se estableció que para esta fase de la enfermedad, la sensibilidad de la prueba para NS1 estaba entre 71 y 100 %, mientras que para la prueba ELISA para IgM fue de 0 a 50 %, razones que justifican la instauración de ambas técnicas como métodos complementarios para el diagnóstico.

Esto fue corroborado en el presente trabajo, con la determinación del índice kappa, el cual arrojó un valor de 0,514, expresando una concordancia moderada que oscila entre 0,41 y 0,61 según la clasificación de Landis y Koch, lo que no sólo establece la posibilidad de emplear la detección de NS1 como alternativa diagnóstica a la actual prueba ELISA para IgM específica de dengue, sino que también, permite recomendar la utilización simultánea de estas dos técnicas como un complemento eficiente para el diagnóstico de dengue agudo, disminuyendo la probabilidad de resultados falsos positivos o negativos. En el trabajo de Castro-Jorge en Brasil (18), se detectó NS1 entre los días 1 a 8 de la enfermedad, es decir, durante toda la fase aguda, mientras que el aislamiento viral resultó positivo solamente entre el primero y el tercer día, lo que hace de la ELISA para NS1 una prueba alternativa de fácil ejecución, económica y con un periodo de detección superior a otras pruebas virológicas (18).

Hay que recordar que existe la posibilidad de una reacción cruzada en las pruebas de IgM específicas para los flavivirus como en la fiebre amarilla y el dengue, debido a la presencia de epítomos comunes de la proteína de envoltura (E), lo cual representa una dificultad mayor para el diagnóstico en un país endémico como lo es Colombia con circulación simultánea de estos dos virus y con una alta proporción de vacu-

nados contra la fiebre amarilla (12,22,23). En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se evidenció que los ensayos ELISA para IgM contra dengue tienen reacción cruzada en 46,2 % de los pacientes con fiebre amarilla y en 42 % de los vacunados (22).

Como ocurre en la rutina de diagnóstico, en la que no se cuenta con una segunda muestra para la determinación de IgM que corrobore el aumento en el título de anticuerpos, en los casos que presentamos no es posible hablar de un caso agudo, sino de casos de infección reciente por virus dengue (menos de tres meses), que podría estar asociada o no a la infección aguda motivo de consulta actual. Por el contrario, es importante aclarar que la proteína NS1 no se detecta en pacientes con infección por otros flavivirus, como el de la fiebre amarilla (23), como fue reportado en Brasil donde se emplearon muestras negativas para dengue pero con diagnóstico positivo para sarampión, rubéola, fiebre amarilla o vacunados para fiebre amarilla, todos los cuales resultaron negativos para NS1 (19). En ese mismo sentido, en otro trabajo (12) se emplearon muestras negativas para dengue pero positivas para encefalitis japonesa, las cuales resultaron todas negativas para NS1, por lo que se puede concluir que esta prueba de NS1 es específica para dengue.

Por otro lado, es claro que la caracterización clínica de los casos probables de dengue es una herramienta de apoyo, pero resulta de baja especificidad y sensibilidad. Se requiere de pruebas diagnósticas que permitan confirmar un mayor número de casos, ya que es necesario descartar otras enfermedades que cursan con sintomatología similar, como influenza, infecciones eruptivas como rubéola y sarampión y enfermedad diarreica aguda por rotavirus, y otras enfermedades febriles como leptospirosis y malaria (3,17,24). En este trabajo sólo el 43,2 % de los pacientes con sospecha de dengue tuvo una confirmación diagnóstica, resultado similar a los obtenidos en estudios previos (17,18,24).

En este estudio, la mayoría de los pacientes con resultado positivo para dengue era menor de 10 años, y en este mismo grupo etario se presentaron con mayor frecuencia signos de hemorragia y emesis. Mientras tanto, los adultos presentaron más frecuentemente mialgias, artralgias, cefalea y dolor retroorbitario. En general, y con gran relevancia, independientemente del diagnóstico, se observó que los más afectados fueron los menores de 10 años, lo que relaciona las edades extremas como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y sus posibles complicaciones (3), diferente a lo ocurrido en Apartadó (Colombia) donde los más afectados estuvieron entre los 15 y 24 años (25), o

en India, donde los más afectados estuvieron entre los 21 y 30 años de edad (12) o en Cuba donde los más afectados estuvieron entre los 36 y 45 años (26).

Cerca de 90 % del total de pacientes consultaron entre el primero y el sexto día del inicio de los síntomas, periodo durante el cual los síntomas de la enfermedad son más incapacitantes para el paciente, similar a lo descrito para Colombia por Díaz, *et al.* (2006), quienes reportaron un promedio de evolución hasta la consulta de 72,2 horas en los pacientes confirmados para dengue y de 67,2 horas en los pacientes negativos (17). En Malasia, los pacientes confirmados para dengue, consultaron al día 5,1, en promedio (27). En el grupo de pacientes analizados en este trabajo, aquellos con dengue confirmado y que consultaron después del sexto día de enfermedad, tuvieron mayor porcentaje de complicaciones (signos de hemorragia y de extravasación) comparados con los que resultaron negativos para NS1.

En cuanto a los exámenes de laboratorio, se encontró una leucopenia ligera (promedio, 4.578 células/ μ l) en los casos positivos para NS1, en comparación con un promedio de 6.127 células/ μ l en los casos negativos por la técnica para NS1 ($p < 0,05$). Datos similares se reportaron en el estudio de Malasia, en el que los pacientes con dengue tenían un promedio de 3.980 células/ μ l (28) y, en el estudio en Santander (Colombia), en el que los casos positivos tuvieron un promedio de 3.694 células/ μ l, en comparación con el promedio de los casos de no dengue (promedio 4.138 células/ μ l) (17).

Respecto al recuento de plaquetas, en general, se evidenció que los pacientes con una IgM positiva presentaron un promedio de 96.773 células/ μ l, lo que clasificaría como trombocitopenia, mientras que los negativos tenían en promedio 164.147 células/ μ l, diferencia que fue estadísticamente significativa. Estos datos contrastan con estudios previos en los que se reportó un promedio de 48.688 células/ μ l (25) y 90.640 células/ μ l (28) en casos de dengue, o en el estudio colombiano en el que se halló un promedio de 150.000 células/ μ l en pacientes positivos y 201.000 células/ μ l en pacientes negativos (17).

Por último, al evaluar los valores de hematocrito no se encontraron diferencias significativas, lo cual coincide con la afirmación de Méndez y González (29) de que el aumento en el hematocrito es el hallazgo de laboratorio más difícil de encontrar. Se establecieron diferencias significativas en la presencia de erupción cutánea, ausencia de diarrea y recuento leucocitario de menos de 4.000 células/ μ l con un mayor porcentaje en los casos positivos confirmados por la prueba

de NS1 respecto de los negativos ($p < 0,05$). No se logró determinar la asociación de dolor abdominal con la gravedad de la enfermedad, como sí se presentó en estudios previos (25,26, 28).

En resumen, se demostró una complementariedad diagnóstica para la determinación de la proteína no estructural NS1 en pacientes con dengue agudo y la técnica de MAC-ELISA, lo que aseguraría un diagnóstico más acertado que podría conducir a un manejo médico más oportuno y eficaz, que disminuya la posibilidad de complicaciones. Además, los hallazgos clínicos reportados indican un carácter muy inespecífico de los signos y síntomas, que hace imposible la definición de un caso positivo o negativo para dengue, solo por la evaluación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rico-Hesse R. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1462-6.
2. World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Geneva: World Health Organization; 2009.
3. Miranda H, Martínez R, Ospina J, Castaño P. Fiebre por dengue: guías de manejo. *Rev Med (Risaralda)*. 2010;16:41.
4. Instituto Nacional de Salud. Fecha de consulta: 21 de septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=1729>.
5. Secretaría de Salud. Manejo del dengue no grave y el dengue grave. México: Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud; 2008.
6. Martínez-Gutiérrez M, Castellanos J. Dengue hemorrágico, ¿una aberración inmunológica? *Revista ECM*. 2006;11:10-9.
7. van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:166-70.
8. Rodríguez R. Caracterización de cepas de dengue aisladas en epidemias cubanas. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri; 2005.
9. Guzmán MG, Vázquez S. Notes on the laboratory diagnosis of dengue virus. *Rev Cubana Med Trop*. 2002;54:180-8.

10. Huhtamo E, Hasu E, Uzcategui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol.* 2010;47:49-53.
11. Instituto Nacional de Salud. Fecha de consulta: 16 de agosto de 2011. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=1654>.
12. Singh MP, Majumdar M, Singh G, Goyal K, Preet K, Sarwal A, et al. NS1 antigen as an early diagnostic marker in dengue: Report from India. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68:50-4.
13. Acosta C, Gómez I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed.* 2005;16:113-37.
14. Yábar C. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Rev Peru Med Exp.* 2003;20:51-7.
15. Velandia M, Castellanos J. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio.* 2011;15:33-43.
16. Guzmán MG, Jaenisch T, Gaczowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e811.
17. Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Clinical criteria to diagnose dengue in its early stages. *Biomédica.* 2006;26:22-30.
18. Castro-Jorge LA, Machado PR, Favero CA, Borges MC, Passos LM, de Oliveira RM, et al. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *J Med Virol.* 2010;82:1400-5.
19. Lima M da R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e738.
20. Instituto Nacional de Salud. Fecha de consulta: 16 de agosto de 2011. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=38857>.
21. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004;8:390-8.
22. Houghton-Trivino N, Montana D, Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2008;10:299-307.
23. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:1185-9.
24. Borbolla M, Juárez I, González N, García L, Piña O, Rodríguez A. Concordancia entre el diagnóstico clínico y por laboratorio de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue en Tabasco. *Salud en Tabasco.* 2008;14:747-51.
25. Arboleda M, Campuzano M, Restrepo B, Cartagena G. Caracterización clínica de los casos de dengue hospitalizados en la E.S.E. Hospital "Antonio Roldán Betancur", Apartadó, Antioquia, Colombia, 2000. *Rev Biomed.* 2006;26:285-94.
26. Martínez J. Caracterización clinicoepidemiológica y ecográfica de pacientes con dengue confirmado. *MEDISAN.* 2010;14:665-74.
27. Hussin N, Jaafar J, Naing NN, Mat HA, Muhamad AH, Mamat MN. A review of dengue fever incidence in Kota Bharu, Kelantan, Malaysia during the years 1998-2003. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36:1179-86.
28. Alam K, Syed S, Akmal A, Yusuf E. Clinical manifestations and laboratory profile of dengue fever among the Patient's General Hospital, Penang. *Archives of Pharmacy Practice.* 2010;1:25-9.
29. Méndez A, González G. Dengue haemorrhagic fever in children: Ten years of clinical experience. *Biomédica.* 2003;23:180-93.

CONFLICTO DE INTERÉS: los autores no registran conflictos de interés en este artículo.