



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO SEDE ARAGUA
ESPECIALIZACIÓN EN SALUD PÚBLICA**



**DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO, VIROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS
DENGUE: VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN EL ESTADO ARAGUA.
2005-2010**

Autor: Lic. Augusto Tarazón

Maracay, Febrero 2015



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO SEDE ARAGUA
ESPECIALIZACIÓN EN SALUD PÚBLICA**



**DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO, VIROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS
DENGUE: VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN EL ESTADO ARAGUA.
2005-2010**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO ANTE EL ÁREA DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE *ESPECIALISTA EN SALUD PÚBLICA***

Autor: Lic. Augusto Tarazón

Tutores: Dr. Carlos Espino

Lic. Daria Camacho

Maracay, Febrero 2015



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Dirección de Asuntos Estudiantiles
Sede Aragua



ACTA DE DISCUSIÓN TRABAJO DE ESPECIALIZACIÓN

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Especialización titulado:

"DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO, VIROLÓGICO Y MOLECULAR DEL VIRUS DENGUE: VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN EL ESTADO ARAGUA. 2005-2010.

Presentado para optar al grado de **ESPECIALISTA EN SALUD PÚBLICA** por el (la) aspirante:

TARAZÓN SÁNCHEZ, AUGUSTO JOSÉ
C.I. 16.849.756

Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO**.
En Maracay, a los diez días del mes de febrero del año dos mil quince.

Dra. Iris Villalobos
C.I: 3.845.671

Dra. Mireya Prieto
C.I: 3.838.989



Dra. Wuilman Gómez
C.I: 8.809.712

Glenda

"Democracia y Autonomía, garantía de presente y futuro Universitario"
Final Av. Leonardo Ruiz Pineda - La Morita - Edo. Aragua
Telf. 0241-6004000 - 6005000 ext. 404141

Diagnóstico inmunológico, virológico y molecular del virus dengue: Vigilancia Epidemiológica en el estado Aragua. 2005-2010

Augusto J. Tarazón Sánchez

Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV) | Universidad de Carabobo - Corporación de Salud del Estado Aragua, Maracay, Venezuela

Resumen

Venezuela es un país endemo-epidémico e hiperendémico con circulación simultánea de tres serotipos de dengue desde 1989. En esta investigación se analizó la ocurrencia y diagnóstico del dengue entre 2005 y 2010 relacionados con grupos de edades y procedencia, de acuerdo a resultados de laboratorio. Los datos de 58544 pacientes, de edades entre 15 días y 98 años, evidenciaron elevada vulnerabilidad en menores de 14 años para contraer la enfermedad, sin diferencia entre sexos y mayor procedencia de pacientes de municipios con alta densidad poblacional. El diagnóstico de laboratorio demostró mayor positividad a MAC-ELISA (66,5%) entre los días 7 y 8 desde el inicio de la enfermedad; para RT-PCR (38,1%) y AIV (8,85%) entre los días 2 y 3, confirmando así los casos y patrón de hiperendemicidad durante el período estudiado. MAC-ELISA ayudó a definir los casos probables, y la posibilidad de confirmarlos al analizar una muestra a partir del día 7. Hubo un incremento de casos sospechosos a partir de 2006 que afectó el diagnóstico confirmatorio de dengue al limitar la ejecución de algunos ensayos. En general, pudo observarse un adecuado uso de las técnicas diagnósticas para infecciones por DENV que permitió definir los casos como probables, confirmados, negativos e indeterminados. Resultó de especial interés observar el esfuerzo realizado por el personal del sistema de salud y del laboratorio para ofrecer un óptimo resultado al diagnóstico de infecciones por DENV a pesar del déficit de reactivos durante los periodos de epidemia.

Palabras clave: dengue, vigilancia epidemiológica, diagnóstico virológico

Immunological, virological and molecular diagnosis of dengue virus: Epidemiological Surveillance in Aragua State. 2005-2010

Summary

Venezuela is an endemic-epidemic and hyperendemic country with simultaneous movement of three dengue serotypes since 1989. In this study was analyzed the occurrence and diagnosis of dengue between 2005 and 2010 related to age and origin according to laboratory results. Data from 58544 patients between 15 days and 98 years old, showed high vulnerability to the disease in children under 14 years without differences between sexes and, more patients from municipalities with high population density. Laboratory diagnosis showed greater positivity to MAC-ELISA (66.5%) between 7 and 8 days from the onset of disease; for RT-PCR (38.1%) and AIV (8.85%) between days 2 and 3, thus confirming cases and hyperendemic pattern during the study period. MAC-ELISA defined the cases as probable and the possibility of confirmation to evaluate a sample from day 7. An increase of suspected cases from 2006 affected the confirmatory diagnosis of dengue, restricting the performance of some tests. In general, an appropriate use of diagnostic techniques was observed and allowed to define the DENV infections in probable, confirmed, negative and indeterminate. It is particularly interesting to note the efforts of the staff of the health system and laboratory for optimum results in the diagnosis of DENV infections, despite the deficit reagents during epidemic periods.

Keywords: dengue, epidemiological surveillance, virological diagnosis

Introducción

Las infecciones por virus Dengue (DENV) representan la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos a humanos a nivel mundial ⁽¹⁾. Es ocasionada por cualquiera de los serotipos que conforman el complejo dengue (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4). Clínicamente evoluciona de manera asintomática, o sintomática como fiebre dengue (FD), fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD) ⁽²⁾. Sin embargo, desde 2009 se establecen dos formas de la enfermedad, dengue y dengue grave, el primero está dividido en dos grupos, con y sin signos de alarma ⁽³⁾.

El dengue es un problema de salud pública a nivel mundial y particularmente en Venezuela ^(4,5). La primera epidemia de casos severos en el país ocurrió a finales de 1989, cuando se reportaron más de 6000 casos hemorrágicos con 73 muertes. En esa oportunidad se identificaron los serotipos DENV1, DENV2 y DENV4 como causa de la epidemia; sin embargo, los casos severos y fatales se asociaron al serotipo DENV2 ⁽⁶⁾. En esta epidemia, el estado Aragua a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica, confirmó 599 casos de dengue por aislamiento y serología, 311 (52%) fueron clasificados como FHD ^(7,8). Los primeros casos hemorrágicos notificados durante esta epidemia fueron pacientes diagnosticados en la ciudad de Maracay. Desde entonces, se reportó la circulación de más de un serotipo viral, posteriormente en 2001 se registra la introducción en el país del serotipo DENV3 causando un brote de gran importancia en Venezuela. A partir de este evento, circulan en el país los cuatro serotipos virales ⁽⁹⁾.

La obtención de estos hallazgos fueron reportados por el sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua, mediante la confirmación de casos realizado por el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), cuya creación surgió de la necesidad de las autoridades regionales de salud de contar con una institución propia, cuyo objetivo primordial era dar respuesta oportunas a los casos sospechosos de

dengue a través de la detección de DENV mediante técnicas inmunológicas, virológicas y moleculares, así como su diferenciación con otros virus, como rubéola y sarampión, sin la necesidad de remitir las muestras al Instituto Nacional de Higiene “*Rafael Rangel*” en la ciudad de Caracas. Es importante resaltar que LARDIDEV fue creado en 1995, gracias a la exigencia de un equipo de epidemiólogos del estado Aragua y el esfuerzo conjunto de cuatro instituciones, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua, FUNDACITE Aragua, CORPOSALUD Aragua y la Dirección Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, con la finalidad de prestar un servicio rápido y confiable al sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua luego de la epidemia de 1989, donde la ciudad de Maracay fue epicentro de la misma y se realizó el diagnóstico de los primeros casos hemorrágicos. En la actualidad, el laboratorio funciona como centro de referencia y apoyo para los centros de salud y unidades de investigación que planifican y ejecutan proyectos relacionados con el virus dengue en Aragua y estados vecinos ⁽¹⁰⁾.

A pesar de la experiencia obtenida en estos años, el manejo de los casos de dengue en el estado Aragua ha sido enfocado hacia el diagnóstico clínico y epidemiológico; sin embargo, no hay reportes que describan la situación de la enfermedad desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, considerando los parámetros del protocolo de análisis que se ha venido aplicando en esta entidad federal desde el año 1995.

En este trabajo, se describió y analizó la dinámica de los resultados obtenidos del diagnóstico de laboratorio en la vigilancia del dengue, específicamente: la proporción de casos probables, confirmados, negativos e indeterminados y su relación con grupos de edades y procedencia. Asimismo, se evidenció el tiempo óptimo para la obtención de las muestras en los pacientes sospechosos de padecer dengue, de acuerdo al tipo de análisis realizado. De igual forma, se estableció la distribución de los serotipos de DENV por años de estudio

y su frecuencia respecto a grupos de edades. Este análisis se realizó con la finalidad de detallar las características de los resultados, producto de los procedimientos diagnósticos llevados a cabo en el laboratorio a lo largo de seis años (enero 2005-diciembre 2010) de vigilancia epidemiológica.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio: se realizó un estudio de tipo descriptivo, donde se consideraron los datos clínico-epidemiológicos de 58544 pacientes con sospecha de dengue registrados en la base de datos de LARDIDEV, los cuales fueron captados por el sistema regional de vigilancia epidemiológica del dengue en el estado Aragua entre los años 2005 y 2010, a través de los diferentes centros de salud adscritos a la Corporación de Salud del estado Aragua (CORPOSALUD Aragua), a la red del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS) y los establecimientos de salud privados.

Diagnóstico de laboratorio: a) Inmunológico: detección de anticuerpos IgM anti-dengue realizada mediante la técnica MAC-ELISA ⁽¹¹⁾; b) Viroológicas: a través del Aislamiento e Identificación Viral (AIV) ⁽¹²⁾; y c) Moleculares: mediante la técnica RT-PCR ⁽¹³⁾, para lo cual se realizó la extracción del ARN viral de las muestras de sueros mediante el uso de estuches comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

Definición de caso: se realizó de acuerdo a criterios establecidos por OMS ⁽³⁾ como: a) Caso sospechoso: todas las muestras que ingresan a LARDIDEV con impresión diagnóstica de infección por DENV; b) Caso probable: muestras IgM positivo en fase aguda o convaleciente sin PCR/AIV realizado; c) Caso confirmado: muestras PCR/AIV positivo a DENV o con sueros pareados donde se demuestre seroconversión de anticuerpos IgM; d) Caso negativo: muestras IgM y PCR/AIV negativo a DENV o sueros pareados IgM negativos. En cuanto a aquellos casos cuyos resultados de laboratorio no fueron concluyentes, por no

cumplir con los parámetros establecidos por OMS o porque no pudieron ser procesadas o validadas por otras técnicas de diagnóstico, se denominaron casos indeterminados ⁽¹⁴⁾. También se consideraron casos indeterminados a aquellas muestras con IgM negativo en sueros de fase aguda a los que no se les pudo realizar PCR/AIV debido a las malas condiciones o características de la muestra al momento del ingreso al laboratorio. Estos casos no pueden ser reportados como positivo o negativo, pero siguen siendo casos sospechosos.

Análisis estadístico y epidemiológico: los registros fueron ingresados en una base de datos en el programa *Microsoft Access*[™] ⁽¹⁵⁾. El procesamiento estadístico de los mismos se realizó mediante el programa *Epi Info*[™] 7.0.8.3 ⁽¹⁶⁾, lo que permitió la elaboración de tablas y figuras con los valores calculados para las frecuencias absolutas y relativas de las variables en estudio. Los casos fueron definidos como probables, confirmados, negativos e indeterminados de acuerdo al resultado obtenido y la técnica empleada. Luego se analizaron los grupos de edades y procedencia en relación a la definición de los casos. De igual forma, se realizó la distribución porcentual de los serotipos circulantes en el estado Aragua durante el periodo de estudio, así como su frecuencia de acuerdo a los grupos de edad.

Resultados

En este estudio se analizaron los resultados correspondientes a 58544 muestras de pacientes con sospecha de infección por DENV de edades comprendidas entre los 15 días de nacido y 98 años, ingresadas a LARDIDEV a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica durante el período enero 2005-diciembre 2010. Los casos fueron inicialmente organizados por grupos de edades y procedencia de acuerdo al año del registro en el sistema (Tabla 1).

En relación a la distribución por grupos de edades, la mayoría se concentró en menores de 14 años con un total de 36190 casos (61,5%), seguidos por el

grupo de adultos en edades entre 15 y 40 años con 18108 casos (31,2%). La menor frecuencia de casos se observó en adultos entre 41 y 60 años (5,7%) y mayores de 61 años (1,6%).

Respecto a la procedencia, la mayor cantidad se agrupó, en el municipio Girardot, 15645 casos (26,7%). Dicho predominio se mostró durante todo el periodo de estudio. En segundo lugar el municipio Linares Alcántara, 6620 casos (11,3%); seguidos por Mariño [6226 (10,6%)]; Mario Briceño Iragorry [5126 (8,8%)]; Sucre [4498 (7,7%)]; José Félix Ribas [4437 (7,6%)] y Libertador [3896 (6,7%)]. Los municipios Camatagua, San Casimiro, San Sebastián, Urdaneta y Zamora que constituyen el eje sur registraron 6619 casos (11,3%), mientras que Bolívar, Costa de Oro, Lamas, Revenga, Santos Michelena y Tovar registraron, en conjunto, un total de 5475 (9,4%) (Tabla 1).

De acuerdo a estos resultados, se observó una clara tendencia al ascenso para toda la entidad federal durante los años 2005 y 2007, hecho que fue evidenciado por un incremento de 4239 a 16697 casos, que luego disminuye en más de 50% para el 2008. Para los años 2009 y 2010, se registraron 13965 y 9282 casos respectivamente.

Tabla 1. Casos registrados en LARDIDEV a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua durante el período 2005-2010 clasificados de acuerdo a las variables grupo de edad y municipio

Grupo de edad	2005		2006		2007		2008		2009		2010		Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
≤14 años	2561	60,4	4428	65,9	10644	63,8	4493	58,8	8626	61,8	5438	58,6	36190
15-40 años	1357	32,0	1928	28,7	4890	29,3	2471	32,4	4383	31,4	3079	33,2	18108
41-60 años	250	5,9	293	4,4	918	5,5	522	6,8	772	5,5	562	6,1	3317
≥61 años	71	1,7	75	1,1	245	1,5	151	2,0	184	1,3	203	2,2	929
Municipio													
Girardot	909	21,4	2025	30,1	4522	27,1	1861	24,4	3688	26,4	2642	28,5	15647
Mariño	492	11,6	607	9,0	2232	13,4	733	9,6	1523	10,9	639	6,9	6226
J. F. Ribas	321	7,6	429	6,4	1179	7,1	765	10,0	1266	9,1	477	5,1	4437
L. Alcántara	438	10,3	856	12,7	1745	10,5	714	9,4	1795	12,9	1072	11,6	6620
Sucre	621	14,7	473	7,0	1008	6,0	777	10,2	990	7,1	629	6,8	4498
Libertador	192	4,5	365	5,4	1063	6,4	557	7,3	930	6,7	789	8,5	3896
M. B. Iragorry	335	7,9	592	8,8	1439	8,6	538	7,0	1267	9,1	955	10,3	5126
Eje Sur	493	11,6	677	10,1	1888	11,3	954	12,5	1322	9,5	1285	13,8	6619
Otros	438	10,3	700	10,4	1621	9,7	738	9,7	1184	8,5	794	8,6	5475
Total	4239		6724		16697		7637		13965		9282		58544

Eje Sur: Camatagua-San Casimiro-San Sebastián-Urdaneta-Zamora. **Otros:** Bolívar-Costa de Oro-Lamas-Revenga-Santos Michelena-Tovar (**Fuente:** Base de datos de LARDIDEV)

Una vez caracterizada la población en estudio de acuerdo a las variables epidemiológicas previamente mencionadas, se procedió a realizar la definición de los casos considerando los resultados de laboratorio obtenidos mediante las pruebas diagnósticas (MAC-ELISA, AIV y/o RT-PCR). Se determinó que 25656 pacientes (43,8%) obtuvieron diagnóstico de casos probables y 2707 (4,6%) fueron descritos como confirmados positivos. Asimismo, 14832 (25,3%) fueron confirmados negativos, mientras que 15349 de los casos (26,2%) quedaron con diagnóstico indeterminado.

En cuanto a la variable edad, se evidenció como los grupos de menor edad presentaron los porcentajes más altos de casos confirmados, 4,7% en menores de 14 años y 4,9% en adultos entre 15 y 40 años, contrastando con el grupo de 61 años o más con 2,6 % de casos confirmados.

Respecto a la procedencia, el municipio Mario Briceño Iragorry obtuvo el porcentaje más alto de casos confirmados (6,8%) y casos indeterminados

(31,0%). De los casos probables y negativos, la mayor frecuencia se registró en el municipio Libertador, 50,8% y 28,9% respectivamente. Entre los años 2005 y 2010, la variación porcentual de los casos probables subió de 39,6 a 45,2; los casos confirmados positivos a dengue disminuyeron de 8,4% a 4,8%; los casos negativos bajaron de 44,2% a 24,1%; y, los casos indeterminados aumentaron de 7,9% a 25,9% (Tabla 2).

Tabla 2. Casos probables, confirmados, negativos e indeterminados registrados en LARDIDEV a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua, clasificados por grupo de edad, municipio y año

Grupo de edad	Probables		Confirmados		Negativos		Indeterminados		Total
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
≤14 años	17821	49,2	1686	4,7	7896	21,8	8787	24,3	36190
15-40 años	6548	36,2	892	4,9	5288	29,2	5380	29,7	18108
41-60 años	1021	30,8	105	3,2	1272	38,4	919	27,7	3317
≥61 años	266	28,6	24	2,6	376	40,5	263	28,3	929
Municipio									
Girardot	7517	48,0	825	5,3	4412	28,2	2893	18,5	15647
Mariño	2768	44,5	303	4,9	1542	24,8	1613	25,9	6226
J. F. Ribas	1912	43,1	120	2,7	1044	23,5	1361	30,7	4437
L. Alcántara	2941	44,4	271	4,1	1627	24,6	1781	26,9	6620
Sucre	1880	41,8	154	3,4	1096	24,4	1368	30,4	4498
Libertador	1978	50,8	135	3,5	1127	28,9	656	16,8	3896
M. B. Iragorry	2039	39,8	346	6,8	1153	22,5	1588	31,0	5126
Eje Sur	2670	40,3	337	5,1	1500	22,7	2112	31,9	6619
Otros	1951	35,6	216	4,0	1331	24,3	1977	36,1	5475
Año									
2005	1677	39,6	354	8,4	1875	44,2	333	7,9	4239
2006	2567	38,2	321	4,8	2340	34,8	1496	22,3	6724
2007	7576	45,4	779	4,7	3572	21,4	4770	28,6	16697
2008	2456	32,2	239	3,1	2545	33,3	2397	31,4	7637
2009	7188	51,5	566	4,1	2261	16,2	3950	28,3	13965
2010	4192	45,2	448	4,8	2239	24,1	2403	25,9	9282
Total	25656		2707		14832		15349		58544

Eje Sur: Camatagua-San Casimiro-San Sebastián-Urdaneta-Zamora. **Otros:** Bolívar-Costa de Oro-Lamas-Revenga-Santos Michelena-Tovar (**Fuente:** Base de datos de LARDIDEV)

En relación al porcentaje de positividad de los casos respecto al día de obtención de la muestra se observó que 66,5% de los sueros analizados mediante MAC-ELISA mostraron un resultado positivo entre los días 7 y 8, mientras que para la técnica de RT-PCR 38,1% en aquellas muestras que fueron colectadas

tres días luego del inicio de la enfermedad. En el caso de la técnica de AIV la confirmación de casos fue predominante entre los días 2 y 3 con 8,85% de positividad (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de casos positivos a DENV según la técnica de diagnóstico empleada, en relación al número de días posteriores al inicio de la enfermedad durante el periodo 2005-2010 en el estado Aragua

D.P.I.E.	ELISA IgM			RT-PCR			AIV		
	Total	Positivo	%	Total	Positivo	%	Total	Positivo	%
1	805	195	24,2	74	13	17,6	141	4	2,8
2	2705	457	16,9	347	100	28,8	472	40	8,5
3	6065	1271	21,0	680	259	38,1	969	89	9,2
4	10674	3598	33,7	912	318	34,9	1614	106	6,6
5	12857	6421	49,9	639	202	31,6	1783	80	4,5
6	12135	7398	61,0	69	28	40,6	36	2	5,6
7	7773	5149	66,2	33	17	51,5	25	2	8,0
8	4399	2941	66,9	12	4	33,3	15	1	6,7
9	2223	1358	61,1	NR	-	-	NR	-	-
10	1161	598	51,5	NR	-	-	NR	-	-

D.P.I.E: Número de días posteriores al inicio de la enfermedad
(Fuente: Base de datos de LARDIDEV)

NR: No Realizado

Respecto a la distribución de los serotipos de DENV circulantes durante los años en estudio, se observó que para el año 2005 los serotipos DENV1 y DENV3 mostraron 16% de positividad, mientras que para DENV2 y DENV4 fue de 3% y 1%, respectivamente. Durante 2006 hubo un descenso general en la circulación de la mayoría de los serotipos virales, contrario a lo evidenciado el año siguiente del estudio, donde se incrementó el registro para los serotipos DENV2, DENV3 y DENV4, hecho que ocurrió también en 2008. El año 2009, evidencia un aumento de la circulación para DENV1 y DENV3, mientras que para DENV2 y DENV4 un leve descenso. En el año 2010 ascienden todos los serotipos nuevamente. En la dinámica de circulación registrada, resulta de especial interés como DENV1 tiene una marcada tendencia a la disminución hasta 2008, para luego aumentar en los años siguientes (Figura 1).

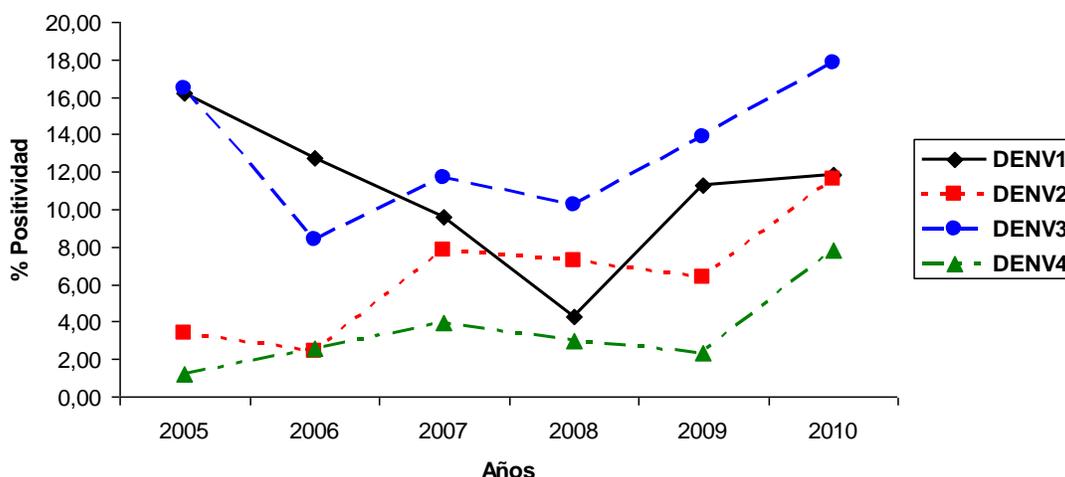


Figura 1. Distribución de los serotipos de DENV entre los años 2005 y 2010 circulantes en el estado Aragua. (Fuente: Base de datos de LARDIDEV)

La distribución de los serotipos de DENV en el estado Aragua se analizó respecto a la variable edad, lo que permitió demostrar que los serotipos DENV1 y DENV3 fueron los que afectaron con mayor frecuencia a todos los grupos, seguidos de DENV2 y por último DENV4. Sin embargo, se observó como los pacientes menores de 14 años y los de edades entre 41 a 60 años, se mostraron susceptibles a padecer principalmente infecciones por el serotipo DENV1 seguido por DENV3, mientras que el grupo de 15 a 40 años y los de 61 años o más fueron infectados por el serotipo DENV3 seguidos por DENV1 (Figura 2).

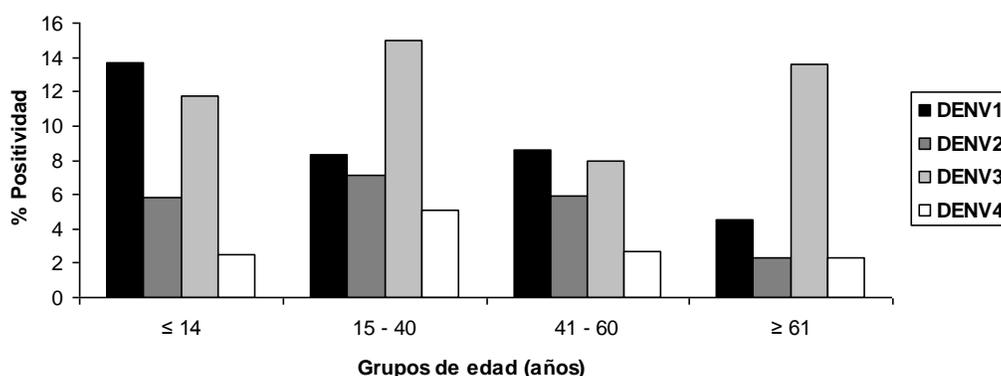


Figura 2. Distribución de los serotipos de DENV por grupos de edad registrados en el sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua durante el periodo 2005-2010. (Fuente: Base de datos de LARDIDEV)

Discusión

Las infecciones por cualquiera de los serotipos DENV representa un problema de salud pública para Venezuela, y de forma particular para el estado Aragua donde la emergencia del dengue, desde el año 1989, ha permitido registrar anualmente, la circulación de al menos dos de los cuatro serotipos virales ⁽⁷⁾, lo que hace de esta entidad federal una zona definida epidemiológicamente como endemo-epidémica e hiperendémica ⁽⁹⁾. Entre las diferentes estrategias establecidas para la lucha contra esta enfermedad, se encuentran los sistemas de vigilancia epidemiológica, los cuales han sido implementados para la detección temprana de brotes, el monitoreo en la introducción de nuevos serotipos virales, así como la distribución de la circulación viral en zonas endémicas ^(17,18,19). De allí, la necesidad de considerar como una estrategia fundamental el análisis de las muestras de todos aquellos pacientes sospechosos de padecer infección mediante técnicas de laboratorio.

En cuanto a la edad, se pudo constatar que los pacientes menores de 14 años mostraron mayor susceptibilidad a infectarse por DENV, ya que representaron 61,5% (36190) del total de casos ingresados a LARDIDEV a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado. Prasith en 2013 ⁽²⁰⁾ describe en un estudio realizado en Asia, que la cantidad de casos reportados fue mayor en menores de 30 años. Otros autores puntualizan que posiblemente, dicha situación se debe a una mayor exposición al vector y a una menor protección inmunológica, probablemente porque a menor edad, menor ha sido el tiempo de exposición a los diferentes serotipos ^(21,22).

Respecto a la procedencia, se observó mayor cantidad de casos en los municipios Girardot (capital del estado), Linares Alcántara, Mariño, Mario Briceño Iragorry, Sucre y Libertador; así como también del municipio José Félix Ribas ubicado al oriente del estado debido a su alta población ⁽²³⁾. Es importante señalar que el sistema registra a los pacientes con base al lugar donde habita y esto garantiza la veracidad del lugar y origen de la infección.

En relación a la interpretación del diagnóstico de laboratorio, basado en los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud ⁽³⁾, se observó que de los 58544 pacientes con sospecha de dengue, 43,8% (25656) fueron definidos como casos probables debido a la presencia de anticuerpos de tipo IgM en una muestra de suero de fase aguda o convaleciente mediante inmunoensayo enzimático (MAC-ELISA, del inglés *IgM capture enzyme linked immunosorbent assay*). Alrededor de 4,6% (2707) fueron casos confirmados positivos a dengue, demostrado por la seroconversión de IgM en sueros pareados por MAC-ELISA; detección de ácido nucleico viral por RT-PCR o aislamiento de DENV en cultivos celulares (Tabla 2).

Los casos confirmados negativos representaron 25,3% (14832); y, los casos cuyos resultados no fueron concluyentes por no cumplir los parámetros establecidos por OMS, se denominaron indeterminados, representando 26,2% (15349) (Tabla 2), el cual es cercano al 34,1% de casos indeterminados reportados por Rigau-Perez y colaboradores ⁽¹⁴⁾ entre 1994 y 1995, en su estudio realizado durante la epidemia de dengue en Puerto Rico.

El resultado de casos indeterminados obtenido en este estudio es de interés por su alto valor, sin embargo una vez analizado lo ocurrido durante el periodo de estudio, se concluyó que ese alto porcentaje pudiese ser debido a: I) muestras hemolizadas o en estado de descomposición; II) muestra insuficiente; III) manejo inadecuado de la muestra al momento de su obtención, envasado, almacenamiento y transporte. Estos factores, ajenos al laboratorio, afectan la calidad del resultado y, en la mayoría de los casos, impiden la realización de algunos ensayos. Es de destacar que LARDIDEV cuenta con el respaldo del estricto control de calidad del Instituto Nacional de Higiene "*Rafael Rangel*" para todas sus técnicas de diagnóstico, el cual es evaluado dos veces por año, asegurando de esta manera la confianza de los resultados obtenidos.

En los años 2007 y 2009, ocurrió en Aragua un importante aumento de la cantidad de casos sospechosos a Dengue que afectó la capacidad de respuesta del programa de prevención y control de la enfermedad, al punto de ser declarado

estado en epidemia ^(24,25). Uno de los componentes más afectados por esta situación fue el Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV), ya que el sistema regional de vigilancia epidemiológica en ambas oportunidades no pudo prever la cantidad de recursos necesarios (reactivos y material de laboratorio) para enfrentar la situación de emergencia. Sin embargo, todas las muestras fueron analizadas mediante MAC-ELISA por su rapidez en ejecución y bajo costo. Para los ensayos moleculares y virológicos hubo la necesidad de seleccionar las muestras de aquellos pacientes cuya severidad de los signos y síntomas lo requería debido al déficit de insumos.

En este estudio también se pudo definir el momento ideal de la toma de muestras de sangre para los diferentes procedimientos diagnósticos y así obtener un óptimo resultado (Tabla 3). Clásicamente, se ha establecido que los anticuerpos de tipo IgM en caso de dengue pueden detectarse alrededor de los días 3 y 5 desde el inicio de los síntomas con un pico máximo al día 15 ⁽³⁾, vale destacar que la respuesta del sistema inmunológico del paciente frente a la infección difiere de acuerdo con el estado inmunitario de cada persona. Sin embargo, fue evidente que la detección de IgM mediante MAC-ELISA tuvo su mayor pico entre los días 7 y 8 desde el inicio de los síntomas, lo que deja ver la necesidad de coleccionar muestras a los pacientes con clínica sugestiva de dengue entre los días previamente mencionados con el fin de corroborar la seroconversión de anticuerpos IgM en aquellos casos con resultados de IgM negativo en los primeros cinco días desde el inicio de los síntomas.

En relación a las técnicas de RT-PCR y aislamiento viral sigue siendo aconsejable coleccionar la muestra preferiblemente el día tres luego del inicio de la enfermedad, momento en el cual la viremia se encuentra en su nivel más alto, tal como lo reportó Comach en 2001 ⁽²⁶⁾ cuando en su estudio encontró 35,6% de positividad, lo cual permite aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Sin embargo, en aquellos pacientes en los cuales se manifieste fiebre posterior al día cinco del inicio de la enfermedad se sugiere coleccionar muestras para su análisis mediante técnicas virológicas y/o moleculares, debido a que este

síntoma es indicativo de la replicación viral y persistencia de la viremia en los pacientes, tal como puede verse reflejado en la tabla 3, donde puede observarse como inclusive hasta el día ocho posterior al inicio de la enfermedad fue posible la detección de partículas virales viables y/o genoma viral, lo que coincide con la publicación de Sudiro en 1997 ⁽²⁷⁾ donde reportó detección de DENV por RT-PCR desde el primer hasta en el octavo día de enfermedad.

Adicionalmente, se pudo observar que la distribución de DENV circulante en el estado Aragua entre los años 2005 y 2010 sufrió un incremento de los cuatro serotipos, DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 (Figura 1), lo cual confirma una situación hiperendémica ⁽⁹⁾, es decir, circulación constante de todos los serotipos de DENV durante el periodo estudiado. Solamente el serotipo DENV1 mostró un descenso progresivo entre 2005 y 2008, pasando de 16% a sólo 4%, para luego incrementarse hasta 12% en 2010 y posicionarse como el segundo serotipo responsable de los casos de dengue en Aragua.

La distribución de los serotipos de DENV de acuerdo a los grupos de edades (Figura 2) mostró que DENV1 y DENV3 afectaron en mayor proporción a pacientes menores de 14 años, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Espino y colaboradores ⁽²⁸⁾ en un estudio realizado en Maracay en el periodo 2006-2007, donde detectaron la circulación de los cuatro serotipos, siendo los menores de 15 años los más afectados. En cuanto a la población mayor a esta edad, el serotipo que causó la mayoría de los casos fue DENV3, lo que probablemente se deba a que esta población no había sido expuesta a esta variante con anterioridad, debido a que su circulación en Venezuela se reportó en julio del año 2000 causando una epidemia en 2001 ⁽⁹⁾.

Al serotipo DENV3 le sigue muy de cerca DENV1, luego DENV2 y por último DENV4 como los causantes de la enfermedad del dengue en cualquiera de sus presentaciones clínicas, haciendo manifiesta la hiperendemia en el estado, tal como se había mencionado previamente. La circulación simultánea de los DENV resulta de especial interés, debido a la asociación entre determinados serotipos de

DENV con la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, en la región de las Américas, la emergencia de la FHD estuvo marcada por dos eventos epidemiológicos de gran impacto, la epidemia cubana ocurrida en 1981 ⁽²⁹⁾ y el segundo brote acaecido en Venezuela entre 1989 y 1990, en ambas situaciones los casos graves se asociaron a DENV2 ⁽⁶⁾. Posteriormente, se demostró el desplazamiento del genotipo Americano de DENV2 por el genotipo Asiático del mismo serotipo y la relación de éste último con la emergencia de los casos severos ^(30,31). Durante la epidemia de dengue de 1998 ocurrida en Aragua (Venezuela), el riesgo de severidad se relacionó a las infecciones por DENV2 ⁽³²⁾.

En relación a los procedimientos diagnósticos utilizados, se observó como la prueba MAC ELISA permitió la identificación de los casos probables; adicionalmente, el hecho de observar una mayor positividad en los días 7 y 8 posterior al inicio de los síntomas sugiere su seroconversión en tales días y a la vez la posibilidad de realizar la confirmación de los casos, siempre y cuando haya sido posible un prueba negativa a IgM en los primeros cinco días de la enfermedad.

Finalmente, luego de analizar la dinámica de los resultados de diagnóstico de laboratorio, en el estudio se pudo evidenciar un aumento del número de casos a partir del año 2006 que colapsó al sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua afectando principalmente al servicio de diagnóstico de laboratorio debido a que la cantidad de reactivos e insumos fue insuficiente para cubrir la demanda durante la epidemia.

Estos resultados se basaron en el análisis de los datos de 58544 pacientes con sospecha de dengue registrados en la base de datos de LARDIDEV a través del sistema regional de vigilancia epidemiológica del estado Aragua entre 2005 y 2010; por lo tanto, este universo permitió valorar la detección de posibles cambios en la ocurrencia de la enfermedad y en los requerimientos diagnósticos, que pueden ayudar a mejorar y fortalecer las actividades de vigilancia, prevención y control del dengue en la entidad.

REFERENCIAS

1. Gubler, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11 (3):480-496.
2. Pan American Health Organization. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Scientific publication N°548. Washington: PAHO 1997.
3. World Health Organization. Dengue. Guidelines for: diagnosis, treatment, prevention and control. *World Health Organization*, Geneva. Switzerland. 2009. (Online: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/> [10/04/2011])
4. Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.*, 2002, 10:100–103.
5. Kourí, G. P., Guzmán, M. G., Bravo, J. R., Triana, C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. *Bull World Health Organ*, 1989; 87: 375-380
6. Panamerican Health Organization. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol. Bull.* 1990. 11: 7-9.
7. Barrera, R., Delgado, N., Jiménez, M., Villalobos, I., Romero I. Estratificación de una ciudad hiperendémica en dengue hemorrágico. *Pan American Journal of Public Health*, 2000, 8: 225-233.
8. Camacho, D., Ferrer, E., Rodríguez-Henríquez, F., Sierra, G., Bosch, I., Schmidt, D., Franco, L., Malo, M., Kochel, T., Tenorio, A., Comach, G. Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. *Revista Salud Online*, 2009, 12 (Sup. 1): 73-87.
9. Uzcátegui, N. Y., Comach, G., Camacho, D., Salcedo, M., Quintana, M. C., Jimenez, M., Sierra, G., Uzcategui, R. C., James, W. S., Turner, S., Holmes, E. C., Gould, E. A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol*, 2003, 84:1569-1575.

10. Laboratorio Regional para el Diagnostico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. 1995. (Online: <http://www.fundabiomed.fcs.uc.edu.ve/lardidev.html> [09/08/2011])
11. Kuno G., Gómez I. & Gubler D. J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987, 36: 153-159.
12. Gubler D, Kuno G, Sather G, Vélez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1984, 33: 158-165.
13. Lanciotti R. S., Calisher C. H., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorndam A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30: 545-551.
14. Rigau-Perez J. G., Vorndam A. V., Clark G. G. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico, 1994–1995. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 64(1, 2), pp. 67–74. (Online: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.199.9721&rep=rep1&type=pdf> [10/02/2012])
15. Microsoft Access. (Online: <http://office.microsoft.com/> [26/01/2012])
16. Centers for Disease Control and Prevention. Software *Epi Info* TM 7.0.8.3. 2011. (Online: <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/> [26/01/2012])
17. Gubler DJ, Castra-Valez A. A program for prevention and control of epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever in Puerto-Rico and the U.S. Virgin Islands. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1991; 25:237–247.
18. Gubler DJ, Suharyono W, Sumarmo Wulur H, Jahja E, Sulianto Saroso J. 1979. Virological surveillance for dengue hemorrhagic fever in Indonesia using the mosquito inoculation technique. *Bulletin of the World Health Organization*. 1979; 57:931–936.

19. Rigau-Perez JG, Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. Gubler DJ, Kuno G, editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Oxford: CAB International; 1997.
20. Prasith N, Keosavanh O, Phengxay M, Stone S, Lewis HC, Tsuyuoka R, Matsui T, Phongmanay P, Khamphongphane B and Arima Y. Assessment of gender distribution in dengue surveillance data, the Lao People's Democratic Republic. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2013, 4(2):17–24.
21. Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Vorndam AV, Clark GG. Dengue activity in Puerto Rico during an interepidemic period (1995-1997). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 64:75-83. (Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425167> [10/02/2012])
22. Arboleda M., Campuzano M., Restrepo BN., Cartagena G. Caracterización clínica de los casos de dengue hospitalizados en la E.S.E. Hospital “Antonio Roldán Betancur”, Apartadó, Antioquia, Colombia, 2000. *Biomédica* 2006; 26:286-94. (Online: <http://www.redalyc.org/pdf/843/84326212.pdf> [13/05/2012])
23. Instituto Geográfico de Venezuela Simón Bolívar, IGVS. Instituto Nacional de Estadística, INE. Censo 2011. (Online: <http://www.redatam.ine.gob.ve/Censo2011/index.html> [15/01/2013])
24. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín Epidemiológico número 52. 2007, Caracas, Venezuela.
25. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín Epidemiológico número 52. 2009, Caracas, Venezuela. (Online: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=9:2010&Itemid=915 [22/05/13])
26. Comach G, Álvarez M, Camacho D, Chiarello A, de Quintana M, Soler M, Sierra G, Guzmán D, Villalobos I, Rodríguez F. Utilidad de la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la vigilancia proactiva y el diagnóstico clínico del dengue. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. Vol. XLI, N° 1 y 2, Enero-Diciembre 2001

(Online:<http://www.iaes.edu.ve/index.php/centro-de-descargas/viewcategory/144-vol41-no1-y-2-ano-2001> [15/01/2012])

27. Sudiro T.M., Ishiko H., Green S., Vaughn D.W., Nisalak A., Kalayanarooj S., Rothman AL, Raengsakulrach B, Janus J, Kurane I, Ennis FA. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'- noncoding region universal primers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 56: 424-429. (Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158052> [15/01/2012])
28. Espino E., Comach G., Sierra G., Guzmán D., Camacho D., Cabello-Quintana M., Chiarello A., Kochel T. Incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas por virus dengue en Maracay, Venezuela: 2006-2007. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. Vol. L, N°1, Enero-Julio, 2010 (Online: <http://www.iaes.edu.ve/index.php/centro-de-descargas/viewcategory/12-vol50-no1-ano-2010> [15/01/2012])
29. Gubler, D. J., Clark, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The emergence of a global health problem. *Emergence Infectious Disease*, 1995, 1: 55-57. (Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2626838/> [05/04/2011])
30. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990; 174:479-493
31. Salas R. A., Tovar D., Barreto A., de Miller E., Leitmeyer K. & Rico-Hesse R. Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990-1997. *Acta Científica Venezolana*. (Suplemento 49) 1998: 33.
32. Camacho D. E., Álvarez M., Soler M., de Quintana M., Chiarello A., Sierra G., Rodríguez-Henríquez F., Comach G. Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el Estado Aragua; Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998. *Investigación Clínica*, 2003, 44: 91.