

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"

Secuencias de infección viral asociadas a la fiebre del dengue durante la epidemia de dengue 3 en la ciudad de La Habana, 2001-2002

Lic. Mayling Álvarez,¹ Lic. Alequis Pavón-Oro,² Dra. Susana Vázquez,³ Lic. Luis Morier,⁴ Dr. Ángel Manuel Álvarez⁵ y Dra. María G. Guzmán⁶

RESUMEN

OBJETIVO: estudiar el papel de la infección secundaria y de la influencia de determinadas secuencias de infección virales en los casos de fiebre del dengue durante la epidemia de dengue 3, en la ciudad de La Habana, 2001-2002. **MÉTODOS:** se estudiaron 141 muestras clínicas de casos confirmados de dengue en la epidemia cubana dengue 3. Todos los casos incluidos fueron clasificados de acuerdo con el criterio de la OMS como casos de fiebre del dengue, 101 de estas muestras fueron colectadas en la fase aguda de la enfermedad y 40 colectadas en la fase convaleciente tardía (16-18 meses después de la enfermedad). **RESULTADOS:** los sueros colectados en la fase convaleciente tardía permitieron conocer las secuencias virales de infección, las cuales en orden descendiente fueron DEN-1/DEN-3, DEN-2/DEN-3 y DEN-1/DEN-2/DEN-3. **CONCLUSIONES:** los resultados confirman que la secuencia de infección DEN-2/DEN-3 estuvo asociada a los casos de fiebre del dengue y no a los de fiebre hemorrágica del dengue; un porcentaje elevado de los casos estudiados se correspondió con una infección secundaria.

Palabras clave: Fiebre del dengue, secuencia de infección viral, sueros, anticuerpos neutralizantes, epidemia cubana 2001-2002, PNRP.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por los virus del dengue (DEN) constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en las áreas tropicales y subtropicales del mundo.¹ El complejo dengue lo constituyen los 4 serotipos (DEN1-4) y una infección con cualquiera de estos puede causar desde una infección asintomática hasta la fiebre del dengue (FD) y la forma más severa de la enfermedad, la fiebre hemorrágica del dengue (FHD). El cuadro severo (FHD) se asocia sobre todo al desarrollo de una

infección secundaria por un serotipo diferente y el incremento de la severidad de la enfermedad es debido probablemente a la presencia de anticuerpos amplificadores de la infección por DEN.²⁻¹⁵

Durante la epidemia de DEN-3 ocurrida en la ciudad de La Habana en el período comprendido entre junio de 2001 y febrero de 2002, se confirmaron 12 443 casos de dengue, 81 de los cuales presentaron el cuadro clínico de FHD.¹⁶ Esta epidemia fue precedida por una epidemia de FD en 1977 y otra de FHD/SCD ocurrida en 1981 causadas por los serotipos DEN-1 y DEN-2, respectiva-

¹ Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK).

² Licenciado en Microbiología. Aspirante a Investigador. IPK.

³ Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Titular. Profesora Titular. IPK.

⁴ Máster en Virología. Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

⁵ Especialista en Epidemiología. IPK.

⁶ Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Titular. Profesora Titular. IPK.

mente.¹⁷ Ambas epidemias afectaron al país completo, la ciudad de La Habana resultó una de las ciudades más afectadas. Posteriormente, en 1997, una nueva epidemia de DEN-2 se reportó en el municipio de Santiago de Cuba.¹⁸ Por último, en septiembre de 2000, un pequeño brote de 138 casos de FD se reportó en 2 áreas de salud de la ciudad de La Habana. Este brote fue causado por los serotipos de DEN-3 y DEN-4 y fue eliminado casi en 3 meses, gracias a las acciones de control establecidas.¹

Recientemente, *Álvarez* y otros demostraron la infección secundaria en 94,7 % de los pacientes que desarrollaron la FHD en la epidemia de 2001. En particular, se observaron las secuencias DEN-1/DEN-3 (77,2 %) y DEN-1/DEN-2/DEN-3 (17,5 %). La secuencia DEN-2/DEN-3 no fue observada.³

En este trabajo sus autores se propusieron estudiar las secuencias de infección virales en un grupo de pacientes de FD y el papel de la infección secundaria en estos. Para ello se colectaron muestras de la fase aguda y convaleciente tardía de la enfermedad de este grupo de pacientes.³

MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

Células de línea BHK-21 clono 15 (riñón de hámster) utilizadas en la prueba de neutralización por reducción del número de placas (PNRP). Estas células fueron gentilmente donadas por el profesor *SB Halstead* (Director Científico de la Iniciativa de la Vacuna Pediátrica para Dengue) y fueron mantenidas a 37 °C en frascos plásticos de 75 cm² en medio MEM (medio mínimo esencial) con aminoácidos no esenciales y 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFBI) 1 h a 56 °C a una razón de pase semanal de 1/8.

VIRUS

En la tabla 1 se muestran las cepas virales empleadas en el estudio.

MUESTRAS DE SUERO

Se estudió un total de 141 muestras de suero. Los sueros incluidos en este estudio fueron colectados de casos de FD clasificados según las Guías para la Prevención y Control del Dengue y la Fiebre Hemorrágica del Dengue en las Améri-

cas.⁴ La enfermedad ocurrió en 2001 durante la epidemia de DEN-3 de la ciudad de La Habana. El virus DEN-3 fue aislado y/o detectado por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en todos los pacientes. Todos los casos clínicos fueron confirmados por un ELISA de captura de IgM.⁵ Los grupos de sueros incluidos en este estudio fueron:

- Grupo I: sueros colectados de 101 casos de FD colectados entre el día 3 y 10 de comienzo de la fiebre, de ellos 13 niños.
- Grupo II: 40 sueros colectados 16-18 meses de la enfermedad. Solo uno de estos procedía de un niño de 16 años.

Todas las muestras de suero fueron almacenadas a –20 °C hasta su estudio. El consentimiento informado fue obtenido de todos los pacientes incluidos en este estudio.

TABLA 1. Características de las cepas de DEN empleadas en el ensayo de neutralización

Serotipo	Cepa	Lugar y año de aislamiento	Historia de pase
DEN-1	Angola	Angola 1988*	4P C636 2P Vero 1P C636 HT**
DEN-2	A15/1981	Cuba 1981	4 PR 4P C636 HT
DEN-3	116/00	Cuba 2000	3P C636 HT
DEN-4	Dominica	Dominica 1981*	7P C636 HT

* Gentilmente donada por el doctor *R. Shope* (ya fallecido) de la Universidad de Texas, EE.UU.; **P: pase. PR: pase en ratón. Vero: célula de línea de riñón de mono verde.

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

ELISA de inhibición (MEI): permitió la confirmación de la infección y la clasificación del caso en primario o secundario.^{6,7} Una muestra de suero obtenida de 5 a 7 d del inicio de la fiebre con un título de anticuerpos IgG ≤ 20 fue considerado como un caso de infección primaria mientras que una muestra de suero con un título de anticuerpos IgG ≥ 1 280 fue considerado como un caso de infección secundaria.

PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE PLACAS (PNRP)

Para medir los anticuerpos neutralizantes se utilizó el método descrito por *Morens* y otros⁸ con algunas modificaciones realizadas por *Álvarez* y otros.⁹ De forma breve, a partir de un cultivo de

células BHK-21 clono 15 con 7 d de siembra se preparó una suspensión de 2×10^5 células/mL en el medio de crecimiento de estas. Posteriormente se sembraron 500 UL de la suspensión celular por pocillo, en placas plásticas de 24 pocillos. Estas se dejaron 1 h en incubación a temperatura ambiente. Durante este tiempo se incubaron a 37 °C en incubadora de CO₂ a 5 % una mezcla de 100 UL de cada dilución de suero (se realizaron diluciones en base 10 de cada muestra de suero desde 1/10 hasta 1/1 000) con 100 UL de la dilución de trabajo de las cepas de virus empleadas para dar 10-20 ufp/50 UL en el volumen final. Después de la incubación, fueron inoculados por triplicado 50 UL de la mezcla virus-suero sobre células BHK-21 previamente sembradas. Estas se incubaron 4 h a 37 °C en incubadora de CO₂ a 5 % y posteriormente se les añadió 500 UL/pocillo del medio de recubrimiento de las células consistente en 3 % de carboximetilcelulosa (viscosidad media) en medio MEM con 10 % de SFBI, antibiótico, glutamina y bicarbonato. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones durante 5 d para la cepa de virus DEN-2, 6 d para la de virus DEN-4 y 7 d para los virus DEN-1 y DEN-3. Después de estos tiempos, fueron teñidas con una solución de naftol *blue black* y ácido acético. Para cada dilución de suero, se calculó la media del número de placas y su porcentaje de reducción, realizando el cálculo del título de anticuerpos por el método de *Russell* y otros.¹⁰

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los valores cinéticos de anticuerpos neutralizantes específicos a cada uno de los serotipos de los virus DEN fueron presentados como el título promedio geométrico (TPG) de anticuerpos neutralizantes en los pacientes con infección primaria o secundaria.

RESULTADOS

El estudio de IgG utilizando MEI permitió clasificar 42 (29,8 %) de los sueros como de infección primaria y 99 (70,2 %) de estos como de infección secundaria.

En la tabla 2 se muestran los TPG de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos en las 101 muestras estudiadas en la fase aguda. 65 de estos sueros (64,3 %) fueron clasificados como de infección secundaria y 23 (22,8 %) como de infección primaria. De estos sueros 13 eran de niños y 12 se clasificaron como infección primaria (92,3 %) y uno (con 16 años) como de infección secundaria, donde se determinó su secuencia de infección como DEN-4/DEN-3 (7,7 %), secuencia esta esperable dada la situación epidemiológica de la capital del país. Es importante señalar que con estas muestras no pudo ser determinada la secuencia de infección por existir en esta etapa aguda de la enfermedad anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos en los pacientes con una infección secundaria.

En la tabla 3 se presentan los TPG de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos en las 40 muestras colectadas después del año de la enfermedad. De estas 1 muestra de suero pertenecía a un niño, la cual se clasificó como de infección primaria y las restantes 39 muestras eran de adultos. De estas últimas muestras, 5 (12,8 %) fueron clasificadas como de infección primaria y las restantes como de infección secundaria. En los casos de infección secundaria estudiados se observaron las secuencias de infección siguientes: en 22 (30,8 %) la secuencia DEN-1/DEN-3, en 6 (15,4 %) la secuencia DEN-1/DEN-2/DEN-3 y en los restantes 6 (15,4 %) la secuencia DEN-2/DEN-3.

TABLA 2. Título promedio geométrico de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos de dengue en niños y adultos de casos de fiebre del dengue, colectados en la fase aguda de la enfermedad

n	PNRP ₅₀ recíproco del título*				Tipo de infección
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	
23	6,34	5,58	21,8	5,74	Adultos, infección primaria
13	7	6	40	7	Niños, infección primaria
65	797,9	116,1	649,2	56,7	Adultos, infección secundaria

*: se aplicó 50 % de reducción del número de placas.

TABLA 3. Título promedio geométrico de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos de dengue en las muestras de suero de niños y adultos colectadas después de 1 año de la enfermedad

n	PNRP ₅₀ recíproco del título*				Tipo de infección
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	
1	27	5	56	5	Niños, infección primaria
5	5,74	7,72	151,8	5	Adultos, infección primaria
34	115,9	47,9	131,6	5	Adultos, infección secundaria
40	76,8	36,0	131,0	5	Total

DISCUSIÓN

Al estudiar 73 % de todos los casos de FHD/SCD en la epidemia 2001/2002 en la ciudad de La Habana se encontró que todos los individuos con FHD estudiados por DEN-3 fueron infectados previamente por DEN-1. Estas infecciones ocurridas en un intervalo de 24 años después de la infección primaria resultaron en casos de FHD/SCD por esta secuencia y en un pequeño número de estos (15 %) se constató la ocurrencia de infección terciaria DEN-1/DEN-2/DEN-3.³

En las muestras convalecientes tardías de casos de FD de este estudio se observaron 3 secuencias de infección (DEN-1/DEN-3, DEN-2/DEN-3 y DEN-1/DEN-2/DEN-3). Otra importante observación fue el hecho que los anticuerpos neutralizantes disminuyeron en el tiempo para los 4 serotipos si se comparan las muestras agudas y las convalecientes.

Los resultados de este trabajo permitieron confirmar que la infección secundaria fue también un factor importante en el desarrollo de los casos de FD. La infección secundaria ha sido confirmada como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. No obstante, otros factores de riesgo como el intervalo entre las infecciones, la edad, las enfermedades crónicas, la secuencia de infección viral y la asociación del segundo serotipo a determinados genotipos han sido identificados como de relativa importancia.

Aunque los 4 serotipos han sido asociados con el desarrollo de la FHD, los virus de DEN-2 y DEN-3 han sido detectados en un mayor porcentaje en infecciones secundarias asociadas a casos de FHD.¹¹ Las secuencias de infección DEN-3/DEN-2, DEN-1/DEN-3 y DEN-2/DEN-3 han sido asociadas con casos de FHD en las epidemias de El Salvador 2000, Cuba 2001-2002 y Brasil 2001, respectivamente.¹²

En Nicaragua en 2005, es interesante señalar que la infección secundaria no fue significativamente correlacionada con la FHD/SCD, en contraste con estudios previos realizados en el Sudeste asiático.^{13,14}

En el Sudeste asiático los casos de FHD/SCD han sido observados sobre todo en el desarrollo de una infección secundaria por DEN.^{11,15} En contraste con esto en las regiones del Pacífico, los casos de FHD/SCD han sido más frecuentes durante las infecciones primarias.^{16,17}

La ocurrencia de casos severos de dengue puede ser explicada por una definición más clásica de la patogénesis viral basada en la diferencia de virulencia entre las cepas virales que circulan en una población específica, en un lugar y tiempo específico, con un vector particular.^{18,19}

En un estudio seroepidemiológico prospectivo realizado en niños en Yogyakarta, Indonesia las secuencias virales de dengue observadas fueron: DEN-2/DEN-1 y DEN-1/DEN-2, esta última mencionada como altamente patogénica en estudios previos.²⁰ La infección secundaria también fue observada en un alto porcentaje en una encuesta seroepidemiológica realizada en niños en edad escolar en Río de Janeiro, Brasil, muy diferente esto a lo obtenido en este estudio, donde en los niños solo se observó la asociación con la infección primaria y en estudios previos realizados en la epidemia cubana de DEN-2 de 1997.^{21,22} Estas diferencias son debido fundamentalmente a que en la ciudad de La Habana no se había tenido transmisión de la enfermedad desde 20 años antes y por tanto los niños no tenían anticuerpos previos a DEN.

En un estudio prospectivo realizado en Rayong, Tailandia, las secuencias virales de infección observadas en la infección secundaria en orden decreciente de magnitud fueron DEN-2/DEN-1, DEN-2/DEN-3 y DEN-2/DEN-4.²³ No obstante en general la mayoría de los estudios de corte prospectivos y las epidemias de dengue han mos-

trado que los casos de FHD ocurren durante una infección secundaria.

Los resultados obtenidos permiten concluir, por una parte, que para definir la secuencia de infección en los casos de infección secundaria se necesita de sueros colectados en la fase convalescente tardía de la enfermedad y, por otra, que las secuencias de infección observadas en los casos de FD fueron DEN-1/DEN-3, DEN-1/DEN-2/DEN-3 y DEN-2/DEN-3. Esto sugiere que la secuencia de infección viral DEN-2/DEN-3 solo fue observada en el cuadro leve de la enfermedad.

Viral infection sequences related to dengue fever in dengue 3 epidemics occurred in the City of Havana, 2001-2002

ABSTRACT

OBJECTIVE: To study the role of secondary infection and of certain viral infection sequences in dengue fever cases during the dengue 3 epidemics occurred in the City of Havana. **METHODS:** One hundred and forty one laboratory-confirmed clinical samples from dengue 3 cases were studied. According to WHO criteria, all included cases were classified as dengue fever cases; 101 of these samples were collected at the acute phase of the disease whereas 40 were collected in the late convalescence (16 to 18 months after the onset of disease). **RESULTS:** The late convalescence serum samples allowed identifying the viral dengue infection sequences, which in downward order were DENV-1/DENV-3, DENV-2/DENV-3 and DENV-1/DENV-2/DENV-3. **CONCLUSIONS:** The results confirmed that the sequence infection DENV-2 / DENV-3 was associated with Dengue Fever Cases but not with the Dengue Hemorrhagic Fever Cases and that a high percentage of studied cases proved to be secondary infection.

Key words: Dengue fever, viral infection sequences, sera, neutralizing antibodies, Cuban epidemic 2001-2002, PNRP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1808-17.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
- Álvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, González D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(6):1113-7.
- WHO/PAHO. DengueNet implementation in the Americas. Report of a WHO/PAHO/CDC Meeting, 9-11 July. San Juan Puerto Rico:WHO/CDS/CSR/GAR/2003.8.; 2002.
- Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Pública.* 1998;3(3):174-8.
- Vázquez S, Bravo JR, Pérez AB, Guzmán MG. [Inhibition ELISA. Its utility for classifying a case of dengue]. *Rev Cubana Med Trop.* 1997;49(2):108-12.
- Vázquez S, Lemos G, Pupo M, Ganson O, Palenzuela D, Indart A, et al. Diagnosis of dengue virus infection by the visual and simple AuBioDOT immunoglobulin M capture system. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1074-7.
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985;22(2):250-4.
- Álvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzmán G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin.* 2005;29:49-57.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1967;99(2):285-90.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):566-72.
- Pelaez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):719-22.
- Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, Imhoff L, Rodríguez Y, Saborio SI, et al. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. *Trop Med Int Health.* 2006;11(6):935-42.
- Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(3):449-56.
- WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva:WHO; 1997.
- Rosen L. Dengue hemorrhagic fever. *Bull Soc Pathol Exot.* 1996;89(2):91-3.
- Kuberski TT. Haemorrhage associated with influenza. *Lancet.* 1977;1(8013):709.
- Murgue B, Cassar O, Guignon M, Chungue E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *J Infect Dis.* 1997;175(6):1497-501.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
- Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):412-9.
- Da Cunha RV, Dias M, Nogueira RM, Chagas N, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Secondary dengue infection in schoolchildren in a dengue endemic area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(6):517-21.
- Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(1):33-42.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984;120(5):653-69.

Recibido: 12 de octubre de 2007. Aprobado: 3 de diciembre de 2007.

Lic. *Mayling Álvarez Vera*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía y Carretera Central Km 6 1/2. La Lisa. AP 601 Marianao 13, Habana, Cuba. Correo electrónico: mayling@ipk.sld.cu