



**DENGUE. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO. Doc actualizado 09/12/2019**

Fuente: "PROTOCOLO DE VIGILANCIA DE DENGUE".

(Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, protocolos aprobados en el año 2014; Revisión de 26/07/2019). Servicio de Epidemiología.

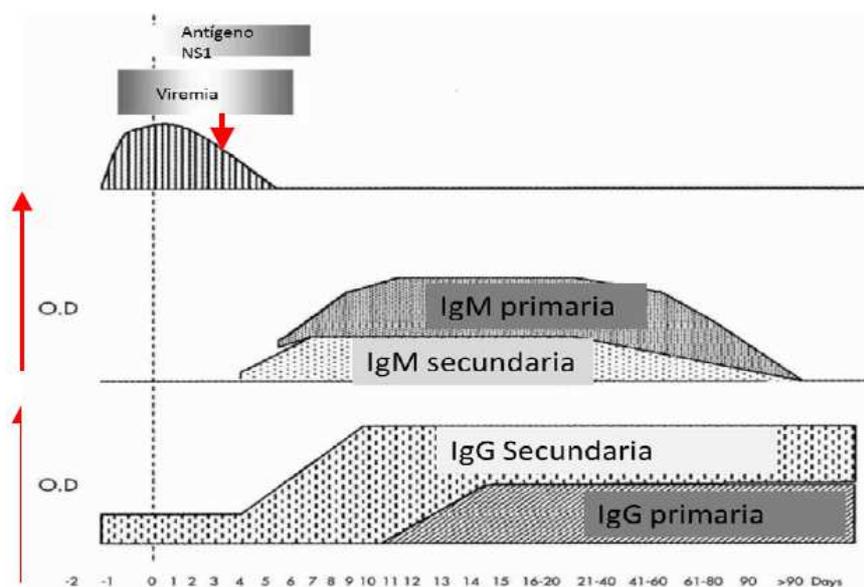
El diagnóstico de laboratorio se hará, bien en las Comunidades Autónomas en caso de que dispongan de las técnicas diagnósticas apropiadas o bien mediante el envío de las muestras del paciente al laboratorio de referencia del Centro Nacional de Microbiología (CNM). Es importante que el resultado del laboratorio esté correctamente confirmado para evitar falsos positivos.

El diagnóstico de confirmación de un caso autóctono debe hacerse en el CNM. También se enviarán aquellos casos que requieran la confirmación del diagnóstico y la caracterización del virus detectado.

La elección de una técnica diagnóstica u otra está en función del momento en que se toma la primera muestra y el tiempo que ha pasado desde el inicio de síntomas. El aislamiento del virus, la detección del ácido nucleico y la detección de antígenos se pueden realizar hasta el quinto día desde el inicio de síntomas (duración de la viremia) aunque hay casos en los que se puede detectar. Al final de la fase aguda de la infección la serología constituye el método de elección. Para este método se necesitarían dos muestras de suero pareadas tomadas con una separación de 15 días. La IgM específica aumenta y es detectable en el 50% de los pacientes alrededor de los días 3 a 5 después del comienzo de síntomas, aumenta al 80% de pacientes para el día 5 y en el 99% de los pacientes se detecta en el día 10. En las infecciones que se producen en un huésped previamente infectado por otro serotipo, la IgM aparece generalmente a los 2 o 3 días del comienzo de la enfermedad, y tiene una duración muy corta. Respecto a los anticuerpos IgG, se pueden detectar en títulos bajos al final de la primera semana de la enfermedad, y aumentan lentamente desde entonces, pudiendo ser detectables desde varios meses siguientes a toda la vida.

Por todo ello, se recomienda que se cite al paciente a los 15 días de la primera toma de muestra. Si bien, no sería necesaria la segunda muestra si en la primera se detecta ARN viral o se aísla al virus.

Figura 1. Curva de marcadores diagnósticos para dengue





**Tabla 1. Lista de métodos diagnósticos para dengue, características y requerimientos**

Método	Espécimen	Toma muestra	Tiempo para resultados	Requerimiento
Cultivo viral: Aislamiento viral en células de mosquito (C6/36), o Vero e identificación por Inmunofluorescencia	Suero*, sangre total, tejidos, LCR	1-5 días de iniciado los síntomas (fase virémica)	5-10 días	BSL3, instalaciones de cultivo celular
Detección de genoma PCR en tiempo real y PCR convencional)	Suero*, sangre total, tejidos, LCR	1-6 días de iniciado los síntomas (fase aguda)	1-2 días	Instalaciones para biología molecular
Detección de antígeno NS1	Suero	1-10 días de iniciado los síntomas (fase aguda)	1 día (ELISA) 1 hora (tiras rápidas)	Equipamiento para ELISA
Método	Espécimen	Toma muestra	Tiempo para resultados	Requerimiento
ELISA IgM captura	Suero	4-5 días de iniciado los síntomas	1-2 días	Equipamiento para ELISA
ELISA IgG (sueros pareados)	Suero	1º. Suero: 5-6 días de iniciado los síntomas y el 2º. más de 14 días	1-2 días	Equipamiento para ELISA
Anticuerpos neutralizantes	Suero	5-14 días	7-10 días	BSL3, Cultivo

Fuente: Organización Panamericana de la Salud. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009.

\*Muestra de preferencia

La orina es una muestra en evaluación que puede dar información relevante para el diagnóstico de este virus.

## Métodos y protocolos en uso en el Centro Nacional de Microbiología, ISCIII

### 1.- Métodos directos

•**Cultivo viral:** en células de mosquitos (*Ae. albopictus*, C6/36 HT) y en células Vero E6.

#### •Detección de genoma:

1. *PCR en tiempo real:* Método diseñado en la región 3` no codificante. PCR en tiempo real de tipo "singleplex" que emplea sondas Taqman. Detecta los 4 serotipos de virus dengue pero no los diferencia. El resultado que se obtiene es si en la muestra se detecta o no genoma de virus dengue.

2. *PCR convencional:*

– *Método nested específico* que amplifica la región C terminal del gen de la envuelta y el N terminal de la proteína no estructural 1 (E/NS1). Es un método multiplex que detecta los 4 serotipos y los diferencia según el tamaño del producto amplificado. Además, por secuenciación del fragmento amplificado, se obtiene información para filogenia y epidemiología molecular.

– *Método nested genérico* diseñado en el gen de la polimerasa viral (NS5). Detecta los 4 serotipos del dengue y además otros flavivirus patógenos como Fiebre Amarilla, Virus del Nilo Occidental Usutu, Encefalitis Japonesa y de San Luis, flavivirus, patógenos o no. Por secuenciación del producto amplificado se identifica el flavivirus que está presente en la muestra.

•**Detección de antígeno NS1:** Método comercial basado en un ELISA tipo sándwich. Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, Francia).



## 2.- Métodos indirectos

**Detección de IgM:** Método de ELISA comercial basado en la captura de anticuerpos tipo IgM. Pambio (E-DEN01M).

**Detección de IgG:** Método comercial de ELISA indirecto.

**Estudio de avidéz de IgG:** Basado en el método anterior, con tratamiento previo de la muestra con urea para determinar la avidéz de anticuerpos tipo IgG y discriminar infecciones primarias de secundarias.

**3.- Métodos rápidos para el diagnóstico de dengue (bajo evaluación pero no en uso en el CNM, ISCIII):** SD Dengue Duo Bioline (STANDARD DIAGNOSTICS), que combina la detección de antígeno NS1 y la detección de anticuerpos IgM/IgG.

### **Envío de muestras al Centro Nacional de Microbiología**

Se utilizará la aplicación informática **GIPI**. Se seguirán las instrucciones, tanto para el envío y tipo de las muestras, como para la solicitud del estudio de brotes; todo ello de acuerdo con los permisos establecidos para los responsables de las comunidades autónomas. Se requiere proporcionar información sobre tiempo de inicio de síntomas y de toma de muestra y sobre lugar del viaje.

Los teléfonos de contacto para el envío de la muestra son:

Área de Orientación Diagnóstica Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III

Carretera Majadahonda-Pozuelo, km 2 28220 Majadahonda-Madrid-ESPAÑA

Tfo: 91 822 37 01 - 91 822 37 23 - 91 822 3694

CNM-Área de Orientación Diagnóstica <cnm-od@isciii.es>