

## Nota técnica: Detección y diferenciación del virus dengue en el contexto de administración de una vacuna contra el dengue<sup>1</sup>

4 de diciembre de 2024

### Objetivo y alcance

Este documento tiene como principal objetivo brindar recomendaciones técnicas para la detección y diferenciación del virus del dengue (DENV) salvaje y/o vacunal, en personas que han recibido la vacuna TAK-003<sup>1</sup> (Qdenga®) y que presentan síntomas compatibles con infección por DENV (1) dentro de los 30 días después de haber recibido una dosis de la vacuna (primera o segunda dosis). Para otras vacunas contra el dengue que sean del mismo tipo (vacunas de virus vivos atenuados) se aplican las mismas recomendaciones de diagnóstico. Asimismo, este documento será revisado y actualizado cuando se disponga de nuevos biológicos, nuevos ensayos clínicos con evidencia adicional, o nuevas plataformas diagnósticas que deban ser consideradas.

### Contexto

El virus del dengue (DENV, especie *Orthoflavivirus denguei*, familia *Flaviviridae*) es el agente etiológico de la enfermedad del dengue. Si bien el dengue es endémico y se presenta en ciclos epidémicos, desde 2023 se viene registrando un marcado e inusual aumento global en la transmisión de los cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4) de este virus, inclusive en zonas previamente libres de dengue. En las Américas, hasta la semana epidemiológica 44 (SE44) del 2024 han sido reportados 12,479,437 casos sospechosos de dengue, cifra que representa un incremento de 204% en comparación al mismo periodo del 2023 y 381% con respecto al promedio de los últimos 5 años (2). En este contexto, algunos países han introducido la vacuna TAK-003, la cual debe ser administrada en un esquema de dos dosis con un intervalo de tres meses entre dosis. Esta vacuna viva atenuada tetravalente contiene cuatro cepas virales: una cepa de DENV-2 y tres quimeras de los demás serotipos que se generaron mediante la sustitución de los genes de la envoltura (E) y de la premembrana (prM) de DENV-2 por los de las cepas del virus del dengue salvaje DENV-1, DENV-3 y DENV-4. Los genes de las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y de la cápside (C) se mantienen constantes para todas las cepas incluidas en la vacuna; todos pertenecen al serotipo DENV-2.

En el ensayo clínico de fase 3 la vacuna TAK-003 mostró eficacia para prevenir la enfermedad por dengue para los 4 serotipos en personas con historia previa de infección por DENV (seropositivos antes de la vacunación) (3). En personas seronegativas antes de la vacunación, la vacuna mostró eficacia para los serotipos 1 y 2, pero no mostró eficacia para los serotipos 3 y 4. De una forma general, los anticuerpos específicos producidos durante las infecciones constituyen una parte importante de la respuesta inmunitaria para neutralizar los patógenos; sin embargo, en el caso de patógenos como el DENV, en determinadas condiciones, los anticuerpos generados en una infección inicial pueden potenciar nuevas infecciones. El ensayo clínico de fase 3 no tuvo suficiente poder

---

<sup>1</sup> Vacuna viva atenuada desarrollada por la compañía *Takeda Pharmaceutical Company Limited*. La mención de empresas específicas o de productos de ciertos fabricantes no implica que se avalen o recomienden por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Asimismo, no existe ninguna relación comercial, ni conflictos de interés para el desarrollo de este documento técnico.

estadístico para descartar el riesgo de enfermedad potenciada por la vacuna en personas seronegativas antes de la vacunación y expuestas después de esta a una infección por DENV salvaje. La enfermedad potenciada por la vacuna en una subpoblación de personas seronegativas es biológicamente plausible y no puede descartarse. Finalmente, la reactivación de la virulencia por el virus vacunal es un riesgo hipotético de la vacuna, aunque en los resultados de la investigación pre-clínica y clínica, no se han identificado casos de personas vacunadas con enfermedad por dengue con el virus vacunal.

Por estos motivos, el Grupo Técnico Asesor (GTA) sobre Enfermedades Prevenibles por Vacunación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala que si algún Estado Miembro deseara introducir la vacuna TAK-003, esta introducción debería llevarse a cabo en un marco que permita la evaluación y el seguimiento de la seguridad y la efectividad de la vacuna, y que las comunidades y los profesionales sanitarios implicados estén plenamente informados de los posibles beneficios y riesgos de la vacunación (4).

Una de las estrategias que se utiliza para hacer seguimiento de la seguridad de una vacuna es la vigilancia de Eventos Supuestamente Atribuibles a Vacunación e Inmunización (ESAVI). Un ESAVI se define como “cualquier situación de salud (signo, hallazgo anormal de laboratorio, síntoma o enfermedad) desfavorable y no intencionada que ocurra luego de la vacunación o inmunización y que no necesariamente tiene una relación causal con el proceso de vacunación o con la vacuna” (5). Después de la vacunación con vacunas vivas atenuadas, es habitual la aparición de síntomas leves que se consideran indicativos de estimulación del sistema inmunitario. Sin embargo, es teóricamente posible que luego de la vacunación se desarrolle una enfermedad clínicamente compatible con dengue causada por una o varias cepas vacunales, que en lugares de circulación del DENV podría confundirse con la enfermedad producida por el virus salvaje.

Para mayor detalle sobre el monitoreo de la seguridad de la vacuna por favor remitirse a las orientaciones de seguridad publicadas por la OPS en el documento “Orientaciones Regionales para la Vigilancia de Seguridad de la Vacuna contra dengue - TAK-003”.

Teniendo en cuenta el escenario actual de la importante circulación de DENV en la Región de las Américas, y considerando los datos disponibles de eficacia de la vacuna TAK-003 y que la protección que confiere no es inmediata (se requiere un tiempo para generar una respuesta inmune protectora después de haber completado el esquema de dos dosis), un individuo vacunado puede ser infectado por el DENV salvaje tanto algunos días antes de la vacunación como luego de haber recibido la vacuna, primera o segunda dosis. Dada la similitud genética y antigénica entre las cepas vacunales y las cepas salvajes, es importante considerar los métodos de laboratorio para la detección y diferenciación de las mismas. Cabe señalar que este documento no aborda el diagnóstico de una eventual enfermedad potenciada por la vacuna en personas seronegativas antes de la vacunación y expuestas después de esta a una infección por DENV salvaje.

### Métodos de laboratorio para la detección de los virus presentes en la vacuna TAK-003

La confirmación por laboratorio de la infección por una cepa salvaje del DENV está basada en pruebas virológicas como la detección de ARN por transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), la detección del antígeno NS1 por ELISA, y en algunos casos el aislamiento viral. En general, las pruebas serológicas (detección de IgM y/o IgG por ELISA) no se consideran confirmatorias en una única muestra (6). Las cepas vacunales se pueden detectar, en principio, usando los mismos ensayos.

### *Detección de ARN por RT-qPCR*

Con relación a la **RT-qPCR**, si bien es un método altamente sensible y específico que podría permitir la detección del virus salvaje y/o vacunal involucrado en la infección o ESAVI, aún no se dispone de un ensayo estandarizado y validado que permita la diferenciación entre cepas vacunales y salvajes. Existen evidencias de que la vacuna TAK-003 puede producir una viremia de hasta 21 días, y en casos excepcionales ha sido descrito hasta 30 días, destacando que esta viremia solo fue observada luego de aplicación de la primera dosis de la vacuna (3, 7 – 9). Por este motivo, en pacientes que cumplan la definición de caso de dengue y que hayan recibido una dosis de la vacuna TAK-003 en los 30 días previos al inicio de síntomas, se recomienda la toma de una muestra de suero para RT-qPCR. Esta muestra debe tomarse hasta 5 días luego del inicio de los síntomas, recordando que cuanto menor sea el tiempo entre la aparición de síntomas y la toma de la muestra, mayor es la probabilidad de detectar el ARN viral.

Es importante notar que la detección de las cepas vacunales por los ensayos de RT-qPCR actualmente disponibles debe ser analizada cuidadosamente. En función del diseño de estos ensayos, es posible que algunas cepas vacunales, en particular las cepas quiméricas de TAK-003 (DENV-1, DENV-3 y DENV-4) no sean detectables. Por ejemplo, la detección de DENV-1 en el ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC (10) se basa en la identificación de una región del gen NS5 de este serotipo (nucleótidos del 8936 al 9047), gen que no está presente en la cepa vacunal quimérica DENV-1 de TAK-003. Para DENV-3 y DENV-4, el mismo ensayo se basa en la identificación de la región prM (nucleótidos del 701 al 775 y del 884 al 973, respectivamente) que está presente en las cepas vacunales quiméricas respectivas. Por lo tanto, se espera que este ensayo permita detectar las cepas vacunales de DENV-2, DENV-3 y DENV-4 pero no la cepa vacunal de DENV-1. Este análisis debe ser realizado para cada uno de los ensayos de RT-qPCR disponibles en la actualidad y que permiten identificar la infección por el DENV salvaje, como por ejemplo el ensayo de RT-PCR Trioplex del CDC (11). Por lo tanto, un resultado positivo por RT-qPCR indicaría de manera genérica la presencia de virus salvaje y/o de las cepas vacunales detectables por el ensayo específico que está siendo usado. Además, si bien un resultado negativo en general descartaría la presencia de un virus salvaje en una muestra de buena calidad tomada en los cinco primeros días después de iniciados los síntomas (6), este resultado no excluye la presencia de una cepa vacunal que no sea detectable por el ensayo o cuya viremia esté por debajo del límite de detección del mismo.

### *Detección de la proteína NS1 por ELISA*

En relación con la **detección de la proteína viral NS1 por ELISA**, un estudio reciente realizado en un grupo de 351 vacunados con una sola dosis mostró que el antígeno NS1 no fue detectado posterior a la vacunación con TAK-003 (12). Sin embargo, ya que los virus vacunales pueden generar proteína NS1 durante su replicación, no se puede descartar que este antígeno pueda ser detectado dependiendo de los niveles de antígeno producidos y de la sensibilidad de la prueba empleada. Además, esta técnica no permite discriminar si el DENV causante de la infección es de tipo salvaje o vacunal, por lo que un resultado positivo solo indicaría de manera genérica la presencia de virus y no diferenciar si es salvaje y/o vacunal.

### *Pruebas serológicas (detección de anticuerpos)*

Los estudios publicados hasta el momento no describen en detalle la cinética de los anticuerpos generados por la primera o la segunda dosis de la vacuna TAK-003, pero se asume esta sea similar a la producida por un virus salvaje. Por lo tanto, los **ensayos serológicos** que detectan anticuerpos IgM e IgG específicos no permiten diferenciar entre respuesta inmune inducida por la vacuna o por un virus salvaje. Además, las dificultades comúnmente relacionadas con el uso de serología en la confirmación de la infección por DENV (persistencia de los anticuerpos después de la infección aguda, reactividad cruzada de los anticuerpos producidos frente a la infección por diferentes

orthoflavivirus en particular en el caso de infecciones secundarias (6)) también aplican para el caso de requerirse dicha confirmación en pacientes vacunados con la vacuna TAK-003 o cualquier otra vacuna viva atenuada contra el dengue. Por lo tanto, un resultado de ELISA IgM positivo no permite discriminar entre una infección aguda o reciente por virus salvaje o por virus vacunal de dengue u otro orthoflavivirus.

### *Secuenciación*

En consideración a lo mencionado anteriormente, en la actualidad la única técnica disponible que nos permitiría realizar la diferenciación y caracterización del DENV salvaje y/o vacunal es la **secuenciación genómica**. Los protocolos genéricos de secuenciación de nueva generación pueden ser utilizados siempre que se verifique que permiten la secuenciación de las cepas presentes en la vacuna TAK-003. De no ser así, los protocolos deberán actualizarse. También es importante resaltar que el análisis bioinformático de los datos de secuenciación obtenidos debe tener en cuenta que en algunos casos tanto secuencias del virus salvaje como del virus vacunal podrían estar presentes en la misma muestra.

Finalmente, es importante considerar el hecho de que la vacuna induce una carga viral menor con relación a la carga viral producida por cepas de DENV salvajes, por lo que es posible que en infecciones mixtas (virus salvaje y virus vacunal) no sea posible identificar las variantes minoritarias correspondientes a la cepa vacunal al utilizar protocolos de secuenciación de nueva generación.

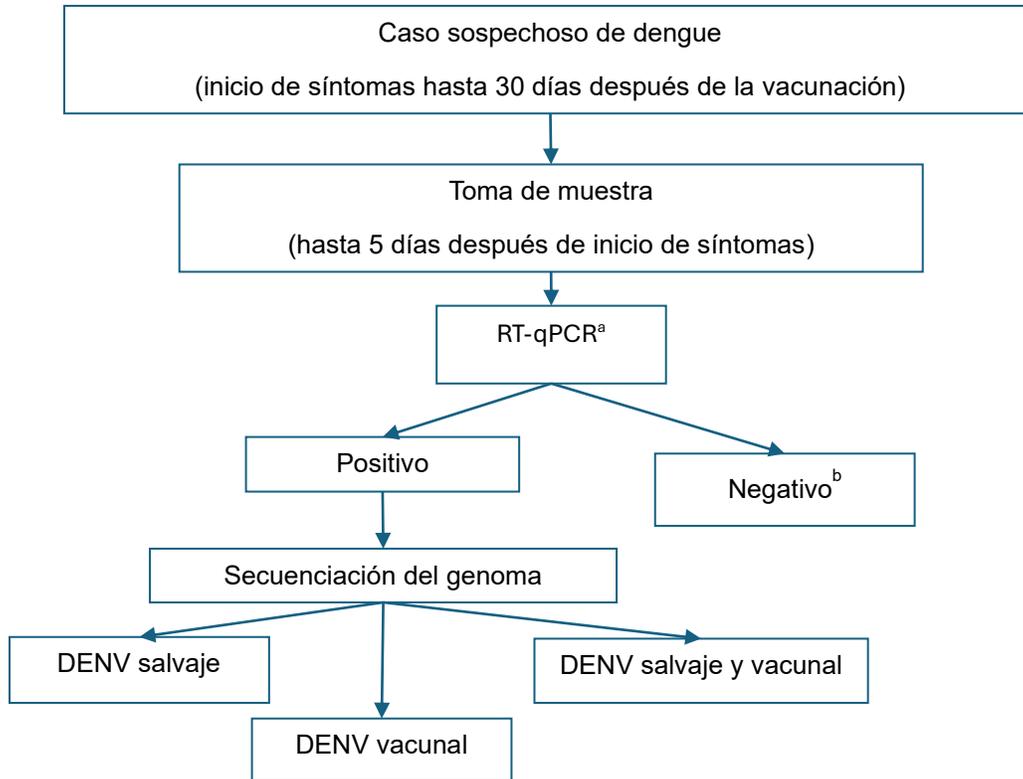
Algunos protocolos de secuenciación utilizando la metodología de Sanger también podrían ser utilizados para realizar la diferenciación entre los virus vacunales y salvajes de dengue, sin embargo, aún no se encuentra disponible un protocolo estandarizado y validado con este objetivo.

### *Ensayos de RT-qPCR específicos*

Es importante remarcar la necesidad de desarrollar y validar ensayos de RT-qPCR que permitan diferenciar entre DENV salvaje y vacunal, como existe hoy en día para el virus de la fiebre amarilla (p. ej., 13). Este tipo de herramienta permitirá determinar rápidamente la presencia de uno o ambos DENV (salvaje y vacunal) sin necesidad de realizar la secuenciación del genoma viral.

## Recomendaciones de diagnóstico

Las recomendaciones diagnósticas aplican para todas las personas que cumplan con la definición de caso sospechoso de dengue<sup>2</sup> con inicio de síntomas en los 30 días después de la vacunación (primera o segunda dosis).



<sup>a</sup> La RT-qPCR es la técnica recomendada durante la fase aguda de la enfermedad y su sensibilidad permite detectar el ARN viral incluso por más de 5 días desde el inicio de síntomas. Si la RT-qPCR no está disponible, se puede considerar la detección del antígeno NS1 por ELISA teniendo en cuenta que su sensibilidad es más baja que la RT-qPCR, y considerando que un resultado positivo debería llevar a la secuenciación mientras que un resultado negativo no descarta totalmente la presencia de virus vacunal.

<sup>b</sup> En general, se observa un descenso de la viremia con el tiempo transcurrido a partir del inicio de síntomas, lo que puede afectar la sensibilidad de la detección molecular, en particular con muestras tomadas a partir del quinto día desde el inicio.

<sup>2</sup> Definición de caso sospechoso (1): Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue, y presenta fiebre aguda habitualmente de 2 a 7 días de evolución, y dos o más de las siguientes manifestaciones: náusea/vómitos, exantema, cefalea/dolor retroorbitario, mialgia/artralgia, petequias o prueba de torniquete positiva, leucopenia, con o sin cualquier signo de alarma o signo de gravedad.

También se considera caso sospechoso a todo niño que reside o haya viajado en los últimos 14 días a una zona con transmisión de dengue que presenta cuadro febril agudo, por lo general, de 2 a 7 días de evolución, sin foco aparente.

Dada la probabilidad de replicación de las cepas vacunales después de 30 días después de la vacunación (primera o segunda dosis), los casos sospechosos identificados después de este periodo deberán analizarse según la recomendación general (6). Sin embargo, en estos casos, los resultados de serología deberán interpretarse en el contexto de la vacunación reciente ya que la duración de los anticuerpos generados por la vacuna se desconoce.

### Tipos de muestras

Las muestras recomendadas son suero en el caso de pacientes con sospecha de dengue y en fallecidos se pueden obtener además muestras de tejidos. Las muestras de tejido (hígado, riñón, pulmón, ganglio linfático, timo, médula ósea y cerebro) pueden ser consideradas tanto para la detección del material genético (RT-qPCR) como para la detección de antígenos virales por inmunohistoquímica. Sin embargo, las técnicas actuales de inmunohistoquímica no permiten diferenciar entre antígenos vacunales y salvajes. Los tejidos también pueden usarse para estudios histopatológicos que permitan caracterizar mejor el caso.

Algunas recomendaciones para la obtención de muestras de tejidos se pueden revisar en el manual de vigilancia de ESAVI (5).

Las recomendaciones para el transporte de las muestras han sido publicadas anteriormente (14).

Se recomienda que las muestras seleccionadas para secuenciación hayan sido transportadas y/o almacenadas siempre manteniendo la cadena de frío y sin haber sufrido repetidos ciclos de congelación y descongelación, esto puede alterar el resultado de secuenciación. Es importante considerar el valor de Ct obtenido mediante RT-qPCR para encaminar la muestra para secuenciación, en general muestras con valores de  $Ct \leq 25$  garantizan una secuenciación de buena calidad, considerando que la muestra haya sido colectada, transportada y almacenada adecuadamente siguiendo las recomendaciones (14).

## Referencias

- 1** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Definiciones de caso, clasificación clínica y fases de la enfermedad Dengue, Chikunguña y Zika. 13 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/definiciones-caso-clasificacion-clinica-fases-enfermedad-dengue-chikunguna-zika>
- 2** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Informe de situación No 44. Situación epidemiológica del dengue en las Américas - Semana epidemiológica 44, 2024. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/informe-situacion-no-44-situacion-epidemiologica-dengue-americas-semana-epidemiologica>
- 3** Biswal, S., et al. (2019) Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *N Engl J Med.* Nov 21;381(21):2009-2019. Epub Nov 6. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1903869>
- 4** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. XI Reunión Ad Hoc del Grupo Técnico Asesor (GTA) sobre Enfermedades Prevenibles por Vacunación. 21 de noviembre del 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/xi-reunion-ad-hoc-grupo-tecnico-asesor-gta-sobre-enfermedades-prevenibles-por-vacunacion>
- 5** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Manual de vigilancia de eventos supuestamente atribuibles a la vacunación o inmunización en la Región de las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275323861>.
- 6** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Nota técnica: Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos de dengue. 1.º de diciembre de 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/nota-tecnica-algoritmo-para-confirmacion-por-laboratorio-casos-dengue>
- 7** George, S.L., et al. (2015) Stinchcomb, Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naive Adults: A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial. *The J of Infec Dis.* Vol. 212, Issue 7, 1 October, Pages 1032–1041. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv179>
- 8** Jackson, L.A., et al. (2018) A phase 1 study of safety and immunogenicity following intradermal administration of a tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine.* Vol. 36, Issue 27, Pages 3976-3983. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.028>
- 9** Tricou, V., et al. (2020) Safety and immunogenicity of a single dose of a tetravalent dengue vaccine with two different serotype-2 potencies in adults in Singapore: A phase 2, double-blind, randomised, controlled trial. *Vaccine.* Vol. 38, Issue 6, Pages 1513-1519. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.061>
- 10** Santiago, G.A., et al. (2013) Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* Jul 11;7(7):e2311. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002311>

**11** Santiago, G.A., et al. (2018) Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. Nat. Commun. 9, 1391. Disponible en inglés en: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03772-1>

**12** Low, J., et al. (2023) Low Serologic and Antigenic Response Profiles Following Vaccination With the Tetravalent Dengue Vaccine TAK-003 in a Phase 2 Randomized Controlled Study Presented at the 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene. October 18-22, Chicago, IL, USA.

**13** Hughes, H.R., et al. (2018) Development of a Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Global Differentiation of Yellow Fever Virus Vaccine-Related Adverse Events from Natural Infections. J Clin Microbiol. May 25;56(6):e00323-18. Disponible en inglés en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00323-18>

**14** Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>.