



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL VIRUS DENGUE Y SU POSIBLE
CORRELACIÓN CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD EN
PACIENTES COLOMBIANOS**

Claudia Patricia Palma Villanueva B.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Bogotá, Colombia
2019

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL VIRUS DENGUE Y SU POSIBLE
CORRELACIÓN CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD EN
PACIENTES COLOMBIANOS**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias: Microbiología

Claudia Patricia Palma Villanueva B.Sc.

Director:

José A. Usme Ciro *Ph.D.*, Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud.

Co-Director:

Jaime E. Castellanos *Ph.D.*, Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Bogotá, Colombia
2019

DEDICATORIA

Con agradecimiento y profundo amor a mis padres por todo su apoyo, confianza y sacrificio para que lograra esta meta que también hicieron suya.

Con amor, a mi hijo, quien es ahora mi más grande razón para ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios padre quien guía mis pasos a cada instante y me permitió llegar hasta aquí.

A mis padres y hermano por todo su apoyo, sus sacrificios y estar siempre ahí cuando más lo necesite.

A mi querido compañero de vida, Chris, por todo su amor, por toda su paciencia, por el inmenso apoyo brindado en todos los sentidos, por su fe en mí, sus consejos y sus críticas profesionales

Al doctor José Usme, por todo su apoyo y confianza, por compartir su conocimiento, por sus consejos, por creer en mí y siempre motivarme a culminar este proceso. Por convertirse en un modelo a seguir.

A Diego Álvarez, por compartir todo su conocimiento sin reserva, por sus enseñanzas, por toda su paciencia, sus risas y su acompañamiento en todo este proceso.

A Alicia Rosales no solo por su apoyo y toda su colaboración, sino por su amistad, por hacer de este proceso de aprendizaje algo compartido.

Al grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, por facilitar la infraestructura y los conocimientos para el desarrollo de este proyecto y a todo el equipo de trabajo por acogerme en su grupo, en especial a Paula Báez por siempre mostrarme su amabilidad y compartir conmigo todos sus conocimientos, experiencias, consejos y risas, a la Dra Nina por todo su apoyo, a la señora Miryam, Adelita por siempre estar dispuestas a colaborar y guiarme en los diferentes trámites.

A todos los docentes de la Universidad Nacional quienes hicieron parte de mi formación, por sus enseñanzas y consejos.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias, por la financiación del proyecto titulado “Búsqueda de determinantes de virulencia en el genoma del virus dengue y su potencial contribución a la patogénesis del dengue grave durante las dos últimas epidemias en Colombia”, con código 210465740977, contrato 638-2014, en el cual se enmarca el presente trabajo de investigación.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 6 |
| 2. PALABRAS CLAVE..... | 6 |
| 3. ABSTRACT | 7 |
| 4. KEYWORDS | 7 |
| 5. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 6. MARCO TEÓRICO..... | 9 |
| 6.1. Epidemiología del dengue..... | 9 |
| 6.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad | 11 |
| 6.3. Tratamiento e inmunoprevención del dengue..... | 12 |
| 6.4. Agente infeccioso causante del dengue y el dengue grave | 12 |
| 6.5. Genoma | 13 |
| 6.6. Patogénesis..... | 13 |
| 6.6.1. Determinantes genéticos de virulencia | 13 |
| 6.6.2. Inmunopotenciación mediada por anticuerpos (ADE) | 15 |
| 6.6.3. Respuesta específica de IgG e IgM en infección primaria y secundaria por virus dengue determinada por pruebas ELISA..... | 16 |
| 6.7. Coinfección de virus Dengue, Zika y Chikungunya..... | 17 |
| 7. JUSTIFICACIÓN..... | 19 |
| 8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 20 |
| 9. HIPOTESIS | 21 |
| 9.1 Hipótesis Nula | 21 |
| 9.2 Hipótesis Alternativa..... | 21 |
| 10. OBJETIVOS | 21 |
| 10.1 Objetivo General..... | 21 |
| 10.2 Objetivos específicos | 21 |
| 11. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 11.1. Selección de muestras clínicas..... | 21 |
| 11.2. Revisión y toma de datos de historias clínicas y cruce de información con siviigila para el ajuste de la clasificación final..... | 22 |
| 11.3. Consideraciones éticas..... | 23 |
| 11.4. Cultivo celular..... | 24 |
| 11.5. Aislamiento viral..... | 25 |
| 11.6. Titulación mediante ensayo de placa | 26 |

| | | |
|-------|--|----|
| 11.7. | Curvas de crecimiento de cepas de virus dengue | 26 |
| 11.8. | Inmunodetección de anticuerpos igM e igG específicos contra el dengue mediante pruebas ELISA de captura e indirecta | 27 |
| 11.9. | Análisis estadístico..... | 28 |
| 12. | RESULTADOS..... | 29 |
| 13. | DISCUSIÓN..... | 51 |
| 13.1. | Coinfecciones DENV-CHIKV durante la epidemia de CHIKV | 54 |
| 13.2. | Cinética de crecimiento. | 55 |
| | CONCLUSIONES..... | 56 |
| 14. | BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

1. RESUMEN

Introducción: El dengue es una infección provocada por el virus del mismo nombre perteneciente al género *Flavivirus*, transmitido principalmente por el vector urbano *Aedes aegypti*. Entre algunos de sus síntomas más frecuentes destacan: cefalea, mialgia, artralgia, dolor retroocular, entre otros, pudiendo llevar al paciente hasta la muerte en casos severos. En Colombia los casos de dengue y la magnitud de las epidemias ha ido en aumento en las últimas décadas, lo cual lo convierte en un importante problema de salud pública. **Objetivo:** Correlacionar las características fenotípicas *in vitro* de cepas del virus dengue 2 y 3 con los diferentes signos y síntomas y el desenlace clínico de la enfermedad. **Metodología:** Se caracterizaron las cepas mediante curvas de crecimiento en células Vero y BHK-21, titulación mediante ensayo de placas, seguido de un análisis de la información documentada en la base de datos de Instituto Nacional de Salud (Laboratorio de Virología y Sivigila) a través de las pruebas estadísticas Tukey, Shapiro Wilk, chi cuadrado y Fisher. **Resultados:** El 100% de los casos de dengue grave correspondió al serotipo DENV-2, así mismo estos correspondieron a infecciones secundarias. Además de acuerdo con las pruebas estadísticas no existe correlación entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad y las curvas de crecimiento de los serotipos circulantes. **Conclusiones:** El presente estudio permitió reconocer la presencia exclusiva de DENV-2 en los casos de dengue grave incluidos, así como la ocurrencia de infecciones secundarias en el 100% de estos casos. Se evidenció la presencia de coinfecciones en el año 2015 y a pesar de que no fue posible establecer una correlación entre las curvas de crecimiento y el desenlace clínico de la enfermedad, se sugieren algunas diferencias en las cinéticas virales que podrían ser reconocidas en futuros estudios.

2. PALABRAS CLAVE

Dengue, clasificación clínica, fenotipo, serotipos, cultivos *in vitro*, cinética de crecimiento

3. ABSTRACT

Introduction: Dengue is an infection caused by the virus of the same name belonging to the genus *Flavivirus*, transmitted mainly by the urban vector *Aedes aegypti*. Among some of its most frequent symptoms are: headache, myalgia, arthralgia, retroocular pain, among others, even being able to take the patient to death in severe cases. In Colombia, dengue cases and the magnitude of epidemics have been increasing in recent decades, which makes it a major public health problem.

Objective: To correlate the phenotypic characteristics *in vitro* of dengue virus 2 and 3 strains with the different signs and symptoms and the clinical outcome of the disease. **Methodology:** Strains were characterized by growth curves in Vero and BHK-21 cells, titration by plaque assay, followed by an analysis of the information documented in the databases of the National Institute of Health (Virology Laboratory and Sivigila) through Tukey, Shapiro Wilk, chi square and Fisher statistical tests.

Results: 100% of the cases of severe dengue corresponded to DENV-2, likewise these corresponded to secondary infections. In addition, according to statistical tests, there is no correlation between the clinical manifestations of the disease and the growth curves of circulating serotypes.

Conclusions: The present diagnostic study recognizes the exclusive presence of DENV-2 in the analyzed severe dengue cases, as well as the occurrence of secondary infections in 100% of these cases. Coinfections were detected in 2015 and despite a correlation between the growth curves and the clinical outcome of the disease was not established, some differences in the viral kinetics could be recognized in future studies.

4. KEYWORDS

Dengue, clinical classification, phenotype, serotypes, *in vitro* culture, growth kinetics

5. INTRODUCCIÓN

El virus dengue (DENV) es el agente causante de la enfermedad del dengue, una enfermedad tipo iceberg que ocurre de forma asintomática en aproximadamente el 75% de los casos y en el 25% restante como un síndrome febril con un amplio espectro de signos y síntomas, entre ellos dolor de cabeza, dolor retro-ocular, mialgias y artralgiás, y en los casos graves manifestaciones hemorrágicas y falla multiorgánica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado el dengue de acuerdo a los niveles de severidad de la enfermedad, como sigue: Dengue Sin Signos de Alarma, Dengue Con Signos de Alarma y Dengue Grave el cual puede resultar en un compromiso intenso de un órgano o sistema (1).

En las últimas décadas, el dengue se ha convertido en un grave problema de salud pública por su alta morbi-mortalidad, afectando regiones tropicales y sub-tropicales con más de 128 países endémicos alrededor del mundo. Durante las dos últimas décadas, la distribución geográfica del dengue, la frecuencia de los ciclos epidémicos y el número de casos de dengue han aumentado considerablemente(2–4) . Además, la proporción de casos por DG y letalidad han incrementado gradualmente en Latinoamérica, donde hasta finales de los años 1990's se habían registrado casos de dengue sin complicaciones (3).

De acuerdo a la OMS, el DENV infecta alrededor de 50 a 100 millones de personas en el mundo, siendo las regiones de América latina, Asia suroccidental y el Pacífico occidental las más afectadas (5). En la región Americana, entre la semana epidemiológica 1 (SE 1) y la semana epidemiológica (SE 22) de 2019, se habían notificado 1.191.815 casos de dengue (118,5 casos por 100.000 habitantes), en donde 5599 de éstos, fueron reportados como DG y con una letalidad del 0,02% (6) En Colombia, esta enfermedad ha ido en aumento desde la década de los 70 siendo uno de los países con mayores tasas de dengue en América Latina con una incidencia de 120,9 casos por cada 100.000 habitantes en riesgo, según el último informe epidemiológico semanal del Instituto Nacional de Salud en 2019 (7)

El DENV es un virus de ARN de cadena sencilla, que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. Hasta el momento se han identificado cuatro serotipos , DENV-1 a -4, los cuales por su alta diversidad genética implican un desafío para el desarrollo de una

vacuna efectiva (8). Si bien los mecanismos que desencadenan el DG no se comprenden completamente, es ampliamente aceptado que los anticuerpos heterólogos de infecciones previas por dengue pueden predisponer a algunas personas a desarrollar la forma grave de la enfermedad cuando se infectan con un segundo serotipo del virus (9).

Aunque las cepas del DENV se diferencian fácilmente sobre una base genotípica, no existe un consenso sobre la existencia de un perfil fenotípico de cepas "virulentas" y "no-virulentas" que se correlacione con las manifestaciones clínicas y desenlace de la enfermedad, excepto algunas cepas que se han atenuado con fines de estudiar una vacuna (10).

El estudio fenotípico de cepas de DENV a través de diferentes modelos como son los estudios clínicos, estudios histopatológicos post-mortem e *in vitro* en células permisivas a la infección por DENV, así como en modelos murinos inmunodeficientes, ha sido útil en el entendimiento de los mecanismos de infección y transmisión de este virus (11).

Existen diferentes parámetros fenotípicos de las cepas de DENV que pueden ser estudiados *in vitro* mediante el desarrollo de ensayos de curvas de crecimiento o cinéticas de replicación en diferentes líneas celulares, tales como las células de mamífero y mosquito. El objetivo del presente estudio fue comparar la cinética de replicación de diferentes cepas de DENV y correlacionarlas con el antecedente de infección, el desarrollo de diferentes signos y síntomas y el desenlace clínico de la enfermedad.

6. MARCO TEÓRICO.

6.1. Epidemiología del dengue

A través de los años, los casos de dengue se han incrementado a nivel mundial, convirtiéndose en un importante problema de salud pública (5,12), con alrededor de 2500 millones de personas en riesgo en más de 125 países endémicos, donde se reportan entre 50 y 200 millones de infecciones anualmente, 10% de las cuales progresan a dengue grave de las cuales alrededor de 20.000 resultan letales (13,14)

Actualmente no existe ni vacuna ni terapia antiviral específica, sin embargo, con la detección oportuna de los casos y un manejo clínico apropiado, la mortalidad por dengue puede ser muy inferior al 1% (15).

La región Asia Pacífico es el epicentro más importante de la enfermedad, responsable del 70% de los casos de dengue que se reportan anualmente en el mundo (15). En China, Singapur, Malasia se ha registrado el mayor número de brotes y epidemias durante la última década. El elevado número de casos se explica principalmente por la urbanización no planeada, necesidades básicas insatisfechas y almacenamiento inadecuado del agua, lo cual determina el éxito en la proliferación del mosquito vector en altas densidades (13,16). Aunque no existen muchos reportes acerca de la epidemiología del dengue en el continente africano y de que muy posiblemente exista un subregistro de los brotes de la enfermedad por la co-circulación del parásito responsable de la malaria, la evidencia sugiere que éstos han ido aumentando en tamaño y frecuencia en la región, reportándose la co-circulación de hasta tres serotipos en algunos países (13,17–19).

En las Américas, en el periodo comprendido entre 1980 y 2007 los casos por fiebre del dengue mostraron un aumento gradual. Sin embargo, a nivel de morbilidad/mortalidad se evidenció un aumento dramático en los casos (4,20), el cual ha sido más evidente en la última década en países como Colombia (2). El dengue en Las Américas presenta un comportamiento cíclico con brotes cada 3-5 años. En las últimas tres décadas un incremento de 4,6 veces de los casos reportados fue observado en las Américas (~ 1 millón de casos reportados en los años 80's a ~ 4,7 millones durante el periodo 200-2007). En los 90's, los serotipos aislados con mayor frecuencia fueron DENV-1 y DENV-2, mientras que para el periodo (2000-7) fueron IDENV-2 y DENV-3, a pesar de los reportes de los 4 serotipos en gran parte de la región. Para el 2010, la mayoría de los países se acogieron a la estrategia que la Organización Panamericana de la salud (PAHO por sus siglas en inglés) implementó luego de los reportes de incremento de casos en la región: Integrated Management Strategy for Dengue Prevention and Control (IMS-dengue) en febrero del 2003, basada en el modelo de seis componentes: epidemiología, entomología, cuidado de la salud, laboratorio, comunicación social y ambiente. Adicionalmente, fue creada la Red de Laboratorios de Dengue de Las Américas, la cual ha sido fortalecida en los últimos años (20)

En Colombia, las condiciones sociodemográficas facilitan la presencia y proliferación en altas densidades del mosquito vector en el 90% del territorio nacional por debajo de los 2200 msnm. Esto, sumado a la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus, a la disponibilidad de población susceptible a la infección de acuerdo a nuevos nacimientos y reemplazo de serotipos y otros macro- y micro-determinantes conlleva un comportamiento cíclico con epidemias cada tres a cinco años (INFORME DEL EVENTO DENGUE INS COLOMBIA, 2017: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/DENGUE%202017.pdf>) (21,22)

La tasa de letalidad de dengue en Colombia ha incrementado paulatinamente (2), siendo atribuible principalmente a determinantes sociales de salud (23). Por ejemplo, para el año 1999 la tasa fue de 1,3%, mientras que para el 2016 fue del 19%, siendo la tasa más alta de letalidad por Dengue de la sub-región andina en Las Américas (24). Según el Instituto Nacional de Salud y soportados por el sistema de información en vigilancia epidemiológica SIVIGILA, durante el año 2018, en el país se reportaron 44825 casos de Dengue, de los cuales 21242 (47,4%) casos correspondieron a Dengue Sin Signos de Alarma (DSSA), 23057 (51,4%) casos a Dengue Con Signos de Alarma (DCSA) y 526 (01,2%) casos a Dengue Grave (DG) (25).

6.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La enfermedad del dengue presenta un amplio espectro de cuadros clínicos, a menudo con evolución clínica favorable donde el paciente tiende a recuperarse de la infección sin mayores complicaciones, sin embargo, el 20% de los pacientes con dengue puede progresar a una enfermedad más grave y potencialmente fatal (26). A pesar de que múltiples estudios han intentado identificar marcadores pronósticos de severidad, los resultados aún no son determinantes en el manejo clínico del paciente. En 2009, la OMS realizó la reclasificación del dengue según las presentaciones clínicas de la enfermedad y el grado de severidad de los síntomas, en las siguientes categorías:

- 1) Dengue sin signos de alarma (DSSA): se caracteriza por una enfermedad febril aguda en la que se observan dos o más de las siguientes manifestaciones: náuseas, emesis, erupción cutánea, mialgia, artralgia, leucopenia y prueba torniquete positiva.

- 2) Dengue con signos de alarma (DCSA): Dolor abdominal intenso, emesis persistente, acumulación clínica de líquidos, sangrado de mucosas, letargia, agitación, hepatomegalia, aumento del hematocrito y trombocitopenia.
- 3) Dengue Grave (DG): se presenta durante el cuarto o quinto día de la enfermedad y se caracteriza por Extravasación grave de plasma que conduce a choque, acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria; sangrado intenso y compromiso orgánico grave (1)

6.3. Tratamiento e inmunoprevención del dengue

A la fecha no existe un tratamiento antiviral de acción directa o indirecta aprobado para el tratamiento del dengue (27). Existe un sinnúmero de drogas que han mostrado efectividad mediante ensayos *in vitro* y preclínicos *in vivo* y también se ha avanzado en la evaluación de drogas que han superado todas las fases clínicas y han logrado la aprobación para uso en humanos en el tratamiento de otras patologías, cuyos segundos usos como anti-DENV podrían ser esperanzadores (28,29).

A pesar de décadas de esfuerzos para lograr una vacuna tetravalente contra el dengue, la única vacuna que alcanzó un desempeño aceptable en los estudios de seguridad, inmunogenicidad y eficacia en Asia y Latinoamérica y que fue recomendada por el Grupo de Expertos Asesores Estratégicos de la OMS (SAGE, Strategic Advisory Group of Experts), fue aquella desarrollada por Sanofi Pasteur y denominada Dengvaxia® (30).

Diversos países aprobaron su uso y algunos de ellos iniciaron la vacunación masiva, la cual fue suspendida luego del reanálisis de los resultados del ensayo clínico fase III, donde se evidencia que la vacuna puede predisponer al dengue grave en aquellos individuos seronegativos, que no habían estado expuestos al virus previamente por infección natural (31)

6.4. Agente infeccioso causante del dengue y el dengue grave

El virus dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Su tamaño es de aproximadamente 50 nm de diámetro, con simetría icosaédrica en su nucleocápside, rodeado por una envoltura lipídica.

Este virus conforma un sero-complejo de cuatro especies estrechamente relacionadas a nivel filogenético con diferencias antigénicas, conocidas como serotipos DENV-1 a DENV-4. Estos serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas e hiperendémicas y todos poseen el potencial de causar la enfermedad conocida como dengue. La infección por el DENV es transmitida por mosquitos hembra del género *Aedes* (principalmente las especies *A. aegypti* y *A. albopictus*), los cuales se distribuyen ampliamente en los países tropicales y subtropicales alrededor del mundo, lo que permite que el virus circule, cada vez con menos restricciones ecológicas (como la amplia distribución de los vectores debido al cambio climático, el desplazamiento de comunidades de áreas rurales a urbanas en busca de nuevas oportunidades laborales o desplazamientos forzados) (32).

6.5. Genoma

Este virus cuenta con un genoma de aproximadamente 10.7 Kb con un único marco abierto de lectura flanqueado por dos regiones sin traducción en 5' y 3'. El ARN genómico viral del DENV es monocatenario de sentido positivo que traduce en un polipéptido completo de aproximadamente 3400 aminoácidos, el cual es procesado por proteasas celulares y virales que liberan tres proteínas estructurales llamadas C, prM/M y E y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación del genoma y del ensamblaje viral (33,34).

6.6. Patogénesis

6.6.1. Determinantes genéticos de virulencia

Algunas características genéticas, biológicas, químicas y estructurales del agente infeccioso han sido asociadas al desarrollo de dengue grave (35); sin embargo, todas las asociaciones de virus con una mayor patogénesis han sido indirectas y laboriosamente lentas en su desarrollo (36). En las últimas décadas han sido muchos los esfuerzos por

implementar modelos in vitro e in vivo que permitan el estudio de la patogénesis del virus, estos modelos han sido especialmente importantes para determinar el papel de acervo genético viral, de cada uno de los productos proteicos virales y de la diseminación del virus e interacción de éste con el sistema inmune. Estos estudios además han permitido avanzar en el desarrollo de vacunas y fármacos antivirales, sin embargo, hasta la fecha, los diferentes modelos presentan limitaciones y son insuficientes para recrear la interacción virus-hospedero durante la infección en el humano (37). Modelos in vivo e in vitro en líneas celulares e inoculación directa de virus de pacientes infectados han demostrado su utilidad para la obtención de información acerca de la aptitud replicativa de las cepas y su potencial patogénico (38–40).

Los blancos principales del virus del dengue son los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas en mamíferos (41), el proceso de infección comienza con la unión del virión a la célula, existen varios receptores posibles para DENV en diferentes tipos de células, sin embargo, el mecanismo general comprende de la interacción de la proteína E con un receptor de superficie de la célula blanco (42). Algunos estudios sugieren que en las infecciones mediadas por el receptor DC-SIGN, solo se concentra el virus en la superficie celular y que es otro factor o correceptor, aún no identificado, responsable de la internalización (43–45). Asimismo, se ha demostrado que la presencia de glicosaminoglicanos y heparán sulfato es necesaria para dar lugar a una infección efectiva en células de mamíferos (46,47).

Al infectar las células dendríticas, el virus se replica en ellas e induce su activación y la producción de citocinas proinflamatorias, lo cual facilita la diseminación del virus hacia los ganglios linfáticos. Diferentes proteínas virales como la NS2A, NS2B, NS3, NS4A y NS5 han sido descritas como potentes inhibidores de la respuesta interferón tipo I (IFN-I) (48,49), un importante componente de la respuesta inmune innata que normalmente se dispara en respuesta a diversos inductores como los son las infecciones virales, lo cual indica que el DENV evade la respuesta inmune impidiendo el establecimiento del estado antiviral que restringe la diseminación del virus en las células del hospedero.

Se ha demostrado que DENV evade la respuesta inmune innata al bloquear el interferón tipo I (IFN-I) y puede inhibir tanto la producción como la señalización de IFN-I (49). La

inhibición de la respuesta de IFN-I requiere de las proteínas virales, NS2A y NS3 para antagonizar completamente la producción de IFN-I. A través de la unión al receptor de interferón α/β (IFN- α/β) en la superficie celular, las citosinas inducen una respuesta de resistencia a la replicación viral (50), que funciona como quimioatrayentes de células Natural Killer (NK), que llevan a la célula infectada a su lisis (51). Las células NK cuentan con receptores para el dominio Fc de la inmunoglobulina G (IgG) que posibilitan la unión de anticuerpos específicos con los antígenos virales en una infección secundaria. Provocando una rápida activación de estas células contra células infectadas por el DENV y su eliminación mediante citólisis directa o a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (52,53).

6.6.2. Inmunopotenciación mediada por anticuerpos (ADE)

Diversos estudios, tanto *in vitro* como epidemiológicos relacionan una infección secundaria por un serotipo de DENV heterólogo, con enfermedad grave, esto debido a que, una infección secundaria en personas preinmunizadas con un serotipo heterólogo, podría agravar la enfermedad en lugar de mitigarla. Este fenómeno se le denomina inmunopotenciación mediada por anticuerpos (ADE, *antibody dependent enhancement*, por sus siglas en inglés) y se fundamenta en que durante una infección primaria se generan anticuerpos neutralizantes contra el serotipo infectante, pero también, anticuerpos no neutralizantes que reaccionan contra serotipos heterólogos. Estos últimos anticuerpos maximizan una infección posterior con un serotipo heterólogo, al favorecer la entrada del virus a través de receptores Fc- γ (receptor de superficie) en monocitos y macrófagos, logrando un mayor número de células infectadas y un aumento en la replicación del virus en su célula blanco. Como consecuencia, un aumento en la producción de mediadores que incrementan la permeabilidad vascular (54–56).

A raíz de esto se infiere que el DENV se comporta epidemiológicamente bajo el "concepto del iceberg", el cual plantea que puede presentarse como una infección asintomática o enfermedad leve, en la mayoría de los casos, siendo esto la base del iceberg, hasta una enfermedad grave y en algunas ocasiones fatal, en un porcentaje mucho menor, siendo esto la punta del iceberg. De igual forma, se postula que la hemorragia y el síndrome de choque no necesariamente están ligados al mismo mecanismo patogénico (57).

De acuerdo con Corrales (2012), se ha demostrado una relación entre el estado de maduración del virión, la infectividad y el reconocimiento por medio de los anticuerpos estableciendo que coexisten varias poblaciones de virus funcionalmente diferentes:

- a) Población de viriones con gran densidad de la proteína precursora de membrana (PrMEM), que representa partículas virales inmaduras y no infecciosas.
- b) Población con una densidad intermedia de esta proteína, la cual es infecciosa, pero puede ser neutralizada por anticuerpos anti-PrMEM.
- c) Una población de viriones maduros, los cuales no pueden ser neutralizados con anticuerpos anti-PrMEM. (58)

De manera que las partículas inmaduras virales tienen un papel en la inmunopotenciación y podrían contribuir al desarrollo de la forma grave del dengue ya que en una infección secundaria pueden infectar a las células blanco en la presencia de anticuerpos no neutralizantes (58).

6.6.3. Respuesta específica de IgG e IgM en infección primaria y secundaria por virus dengue determinada por pruebas ELISA

Las pruebas de inmunodetección IgG e IgM han sido utilizadas ampliamente en la actualidad para la detección y confirmación de la presencia de infección por DENV. Mediante este ensayo ha sido posible la detección de la enfermedad latente y si el individuo ha estado expuesto alguna vez en su vida a la infección, gracias al reconocimiento de anticuerpos en el suero del paciente.

La infección primaria con cualquier serotipo de Denv es caracterizada por la presencia de anticuerpos IgM específicos del virus, 4-5 días después de la aparición de los síntomas, éstos son detectables en suero de 30-90 días, mientras que los anticuerpos IgG permanecen por un largo tiempo, incluso hasta por el resto de la vida. Durante una infección secundaria, sin embargo, los niveles de anticuerpo IgG específicos para DENV en suero es generalmente bajo, pero en esta infección los niveles de IgG crecen mucho más alta y rápidamente que los observados durante la infección primaria y luego permanecen a estos niveles por al menos 30-40 días. Durante una infección primaria, la respuesta de anticuerpo

IgG específica es inicialmente de baja avidéz, la cual se va incrementando gradualmente. Las infecciones secundarias, por el contrario, son caracterizadas por una producción inicial de anticuerpos de alta-avidéz. Dada esta anomalía en la detección de anticuerpos específicos de DENV, el uso combinado de IgM e IgG ha sido propuesto como una estrategia efectiva para la diferenciación serológica de infecciones primarias y secundarias (59).

Un estudio realizado por A. SA-NGASANG *et.al* en 2006, concluyó que los rangos de seroconversión de IgG e IgM son diferentes entre infecciones primarias y secundarias por DENV y han sugerido que la detección de IgG e IgM específicos es necesaria para la determinación de la infección por virus Dengue y para la diferenciación entre infección primaria y secundaria (60).

6.7. Coinfección de virus Dengue, Zika y Chikungunya

Los virus DENV, ZIKV y CHIKV, pertenecen al grupo de arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) que causan actualmente en el mundo algunas de las enfermedades infecciosas emergentes más significativas. Éstos tres arbovirus se encuentran circulantes en las mismas regiones tropicales y subtropicales del mundo y causan enfermedad con similares representaciones clínicas en su fase inicial (61).

La co-circulación de estos tres arbovirus simultáneamente (ZIKV, CHIKV y DENV) en el periodo 2014-2017 en los mismos territorios, en áreas tropicales y subtropicales, llevó a la ocurrencia de coinfecciones en la población, según lo demuestran algunos estudios en Latinoamérica. En Brasil, en el periodo de enero a noviembre de 2016 se analizaron las muestras con sospecha de sufrir una enfermedad infecciosa por arbovirus y se reportaron 12 casos con co-infección, 7 de los cuales tenían DENV-1 y DENV-2. Dos de éstos casos presentaron signos de alarma por dengue y ninguno fue hospitalizado (62). En Colombia, Mercado-Reyes *et.al* (63) encontró que para el brote de infección de Zika en 2016, un total de 23 871 habían sido procesadas hasta el momento, de las cuales, 34 resultaron con coinfección, la mayoría de los casos fueron coinfecciones del tipo CHIKV-ZIKV (28 casos correspondientes al 82,3%), y en menor frecuencia, se presentaron también coinfecciones del tipo DENV-CHIKV y DENV-ZIKV con tres casos cada uno, correspondientes al 8,8%. Del total de casos de coinfección, 7 resultaron ser fatales, dos relacionados a casos de

DENV-CHIKV y 5 a casos de CHIKV-ZIKV (63). Un segundo estudio realizado por Carrillo Hernandez; et.al, 2018 reportó igualmente co-circulación y co-infección de los tres virus en la frontera Colombo-venezolana, en éste se analizaron un total de 82 muestras, sin embargo, aquí se encontró que la coinfección más prevalente fue la DENV-CHIKV encontrada en el 7,64%, seguida de DENV-ZIKV encontrada en el 6,37% y CHIKV-ZIKV encontrada en un 5,10%. Además, se reportaron tres casos con coinfección de los tres virus (1,91%) (24).

Se conoce de los efectos que estos tres virus tienen en mujeres en estado de embarazo, y existen reporte de mujeres con DENV y CHIKV, pero sobretodo y particularmente los efectos que causa el virus ZIKV en el desarrollo del feto, entre ellos la microcefalia y otras alteraciones neurológicas. Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre coinfecciones en mujeres embarazadas. En Sincelejo, Sucre, Colombia, una mujer de 33 años de edad en su semana 14,6 de embarazo presentó un cuadro clínico caracterizado por conjuntivitis bilateral no purulenta, erupción maculopapular pruriginosa intensa en las extremidades superiores, el tórax, y abdomen, dolor de cabeza, artralgia metacarpofalángica y de muñeca bilateral leve a intensa, y edema de extremidades, particularmente de los tobillos. Ella no informó ningún historial de transfusión de sangre o trasplante de órganos. Los frotis de sangre gruesa y fina para la malaria fueron negativos. Los exámenes clínicos fueron normales, a excepción de una leve anemia (con una hemoglobina de 11.5 g/ dl. (rango normal 12.0–14.5 g / dl) y linfopenia con un recuento de linfocitos de 1.03 10⁹ células / l (rango normal 1.2–3.2 10⁹ células / l). Al realizar la prueba de detección por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) trioplex para DENV, CHIKV y ZIKV ésta arrojó resultado positivo para los 3 virus, esto fue confirmado por secuenciación. La paciente no presento alteraciones mayores ni en su proceso de gestación, hasta la semana 29 (64).

Las posibles consecuencias e implicaciones que puedan tener estas co-infecciones en el desenlace clínico de la enfermedad aún son materia de estudio, puesto que los tres virus no solo tienen un comportamiento normal en sus primeras fases de presentación clínica, sino que además comparten maneras similares de respuesta inmune.

7. JUSTIFICACIÓN.

El dengue es una enfermedad causada por el virus del mismo nombre y transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Actualmente es la enfermedad transmitida por artrópodos más importante presente en países tropicales y subtropicales (1,13).

Las representaciones clínicas pueden ir desde asintomáticas, hasta presentar cuadros de fiebre, vómito, diarrea, dolor abdominal, mialgias artralgiás; y formas más severas como manifestaciones hemorrágicas y falla multiorgánica. Siendo agrapadas por la OMS como DSSA,DCSA y DG (1). Éstas representaciones están asociadas a la infección por cualquiera de los 4 serotipos existentes: DENV-1, -2, -3 y -4. Estos serotipos varían en términos de patogenicidad y virulencia, aunque la base de estas diferencias fenotípicas aún es poco entendida (37). Existen algunas hipótesis relacionadas con el tropismo del DENV, su virulencia, la activación del sistema de complemento por acción de la proteína NS1, así como una autoinmunidad transitoria, factores inherentes al huésped, inmunopotenciación mediada por anticuerpos (ADE) que pretenden dar explicación al desarrollo de casos severos de la enfermedad (36,58), sin embargo, aún no existe información precisa sobre la relación de todos estos componentes con un desenlace clínico de la enfermedad.

Se calcula que unos 2.500 millones de personas viven en países endémicos en riesgo y que hay de 50 a 100 millones de casos por año, de los cuales 500.000 se clasifican como dengue grave y con un reporte de más de 20.000 muertes. Según la OMS, el número de casos reportados aumentó de 2,2 millones en 2010 a 3,2 millones en 2015 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (65). En el 2013, se notificaron 2,3 millones de casos tan solo en la Región de las Américas; 37.898 de ellos fueron de dengue grave (4,14). En Colombia, el dengue constituye un serio problema de salud pública debido a la alta distribución del mosquito en todo el territorio nacional, además, en el país circulan los 4 serotipos del DENV, y a que se ha presentado un aumento considerable de los casos graves desde la re-emergencia de la enfermedad en los 70's (66) así como un aumento en la letalidad de la misma (25).

Algunos estudios han reportado relación entre diversos factores con la patogénesis de la enfermedad tanto propios del virus, como su genotipo viral, que conlleva a una mayor respuesta inmune (67–69), así como factores propios del huésped como edad, sexo y

estado nutricional (70–72). Sin embargo, aún no está totalmente clara la posible relación de la severidad de la enfermedad con aspectos fenotípicos del virus como su carga viral (10,73,74). Estudios han sugerido que el desenlace de la enfermedad podría estar dependiendo también de diferencias entre cepas incluso dentro de los mismos serotipos. Estos estudios generalmente son realizados mediante cultivos celulares, por aislamiento viral usualmente en células C6/36 de mosquito *Aedes Albopictus* y evaluados por cinéticas de crecimiento en variedad de modelos celulares como células BHK y células dendríticas humanas. (67,75,76). Estos estudios son de gran importancia ya que permiten evidenciar aspectos como la capacidad replicativa del virus en el tiempo y su poder infeccioso, las tasas de replicación que son vitales para entender su poder de infección en el huésped.

El DENV circula en Colombia de forma endémica desde hace al menos 50 años, diversos estudios han demostrado la acumulación de variabilidad genética al interior del país (77–79), así como el incremento de la letalidad por dengue grave observado en el mismo periodo (0,43 en 2007, 2,28 en 2010 y 4,34 en 2013), para la semana 52 de 2016, se habían confirmado 60 muertes por Dengue en el país, y aunque hay una disminución en los casos, esto puede deberse a las emergencias en estos últimos periodos de otras enfermedades como Chikungunya y Zika, por esto, es pertinente evaluar la relación entre las características fenotípicas que exhiben las diferentes cepas de DENV *in vitro* y las manifestaciones clínicas y desenlace de la enfermedad. Hasta la semana epidemiológica 52 de 2018 se habían notificado en el Sistema de Vigilancia Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud: 44825 casos totales de dengue en ese año, 21242 casos (el 47,4%) sin signos de alarma; 23057 casos (el 51,4 %) con signos de alarma y 526 casos (el 1,2%) de dengue grave.(25).

Con este estudio se busca establecer las características fenotípicas de diferentes cepas basados en las cinéticas de replicación de los serotipos DENV-2 y DENV-3 aisladas de pacientes colombianos y establecer su posible relación con los signos, síntomas y desenlace clínico de la enfermedad.

8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Podrían relacionarse las características fenotípicas *in vitro* de cepas de DENV con el curso y desenlace clínico de la enfermedad en pacientes con dengue y dengue grave?

9. HIPOTESIS

9.1 Hipótesis Nula

Las características fenotípicas *in vitro* en cepas de DENV no se relacionan con el desarrollo de los diferentes signos y síntomas de la enfermedad y su desenlace clínico.

9.2 Hipótesis Alternativa

Las características fenotípicas *in vitro* en cepas de DENV se relacionan con el desarrollo de diferentes signos y síntomas de la enfermedad y su desenlace clínico.

10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo General

Comparar la cinética de replicación de diferentes cepas de DENV y correlacionar las cinéticas de replicación con el desarrollo de diferentes signos y síntomas y el desenlace clínico de la enfermedad.

10.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente cepas de diferentes serotipos de DENV mediante ensayos *in vitro* de cinéticas de crecimiento.
- Identificar las principales manifestaciones clínicas asociadas a los cuadros clínicos de la enfermedad y su clasificación según su estado inmune mediante pruebas de inmunoensayo (ELISA).
- Evaluar la relación entre características fenotípicas *in vitro* de aislados del DENV de pacientes colombianos y el desenlace clínico de la enfermedad.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1. Selección de muestras clínicas

En el estudio se incluyeron muestras de suero de pacientes en fase aguda, remitidas al Laboratorio de Virología (Laboratorio Nacional de Referencia – LRN) del Instituto Nacional de Salud - INS, a través de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública distribuida en todo el territorio nacional, como parte de la vigilancia virológica del dengue en Colombia mediante aislamiento viral, detección y serotipificación de dengue. Como criterios de inclusión se definieron:

- Muestras tomadas durante la fase aguda (hasta el 5^o día desde inicio de síntomas).
- Información clínica asociada.
- Aislamiento viral positivo.
- Alícuota de suero de al menos 200 μ L.
- Recolectadas durante el periodo 2013-2016

Y como criterios de exclusión:

- Muestras lipémicas ó hemolizadas
- Ausencia de información clínica
- Muestras tomadas después del 5^o día desde el inicio de síntomas
- Muestras tomadas antes del 2013.
- Muestras de suero con cantidad insuficiente (menos de 200 μ L).

Las muestras fueron acompañadas de la ficha epidemiológica y resumen de la historia clínica diligenciada al momento de la toma de la muestra. La clasificación final de los pacientes fue corroborada mediante el cruce de la base de datos del presente proyecto, con las bases de datos de Sivigila para los eventos Dengue, Dengue Grave y Mortalidad por Dengue.

11.2. [Revisión y toma de datos de historias clínicas y cruce de información con sivigila para el ajuste de la clasificación final](#)

Los datos acerca de la información clínica de cada paciente, así como la clasificación y el desenlace clínico fueron tomados de las fichas de notificación del SIVIGILA (Sistema de Vigilancia de Salud Pública Nacional), que debe ser llevada y diligenciada por las UPGD (Unidades Primarias Generadoras de Datos) en el territorio nacional para la vigilancia de

eventos de notificación obligatoria y cuyo destino final en una proporción de los casos es el Laboratorio Nacional de Referencia de Virología del Instituto Nacional de Salud, donde se realizan los ensayos virológicos. Dicha información fue sistematizada en una base de datos con el fin de ser utilizada en los análisis estadísticos.

11.3. Consideraciones éticas

De acuerdo a la resolución N° 008430 de 1993 en la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, artículo 11 del capítulo 1 (De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos) se establece que la investigación realizada en este proyecto está clasificada en la categoría de investigación sin riesgo ya que no se realizará ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaran en el estudio. Las muestras necesarias para llevar a cabo el estudio han sido recolectadas por las Unidades Primarias Generadoras de Datos, enviadas a los Laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD), y remitidas al INS como parte del programa de Vigilancia Viroológica del dengue a nivel nacional. En todo el proceso, se siguieron los lineamientos del Manual para la obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud pública, realizado por el INS en 2011 (80).

En esta investigación se hizo uso de la información asociada a los sueros que reposan en el Laboratorio de Virología – INS como parte de la vigilancia virológica. Adicionalmente, dicha información fue complementada con la disponible en las fichas de notificación del SIVIGILA (Dengue Cód. INS: 210, Dengue Grave Cód. INS: 220 y Mortalidad por dengue Cód. INS: 580). Una vez realizado el cruce de información de las diferentes fuentes, se protegió la identidad de los pacientes, mediante la asignación de códigos en las bases de datos del estudio y firma de un acuerdo de confidencialidad por parte del personal involucrado en el proyecto.

Teniendo en cuenta que se utilizó material humano e información asociada, el proyecto se ejecutó siguiendo los principios éticos básicos promulgados en la Declaración de Helsinki adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio de 1964 (<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2957s/18.html>). La utilización de las muestras biológicas almacenadas sin consentimiento específico, se realizó teniendo en cuenta que

la investigación propuesta es de interés científico relevante y que las muestras eran necesarias para la consecución de los objetivos de la investigación, que no existía evidencia de que el sujeto fuente hubiera manifestado su oposición a la utilización de la muestra para investigación y, finalmente, que la investigación no perjudica los intereses del sujeto fuente (http://www2.ula.ve/cdcht/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=219).

11.4. Cultivo celular

Las líneas celulares fueron suministradas por el laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud:

La línea celular C6/36 (ATCC Number: CRL-81), proviene de larvas del mosquito *Aedes albopictus*, son células semiadherentes usadas frecuentemente para el aislamiento, identificación y caracterización de arbovirus, no son células tumorogénicas y son diploides. El cultivo celular fue mantenido en frascos de 75 cm² con Medio Mínimo Esencial de Eagle's (MEM) suplementado con HEPES, suero fetal bovino (SFB) al 8% para su crecimiento y 2% para el mantenimiento de los cultivos, éstas fueron incubadas a 28°C, en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Los pases de células se realizaron en una relación 1:2 a 1:5 mediante el reemplazo del medio de cultivo por medio fresco, remoción mecánica y resuspensión de las células, sin exceder un máximo de 10 pases posteriores al descongelamiento del stock de células.

La línea celular VERO (ATCC Number: CCL-1660) proviene de tejido de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto. Es una línea celular adherente usada frecuentemente para el aislamiento de arbovirus y para la realización de curvas de crecimiento. Fueron mantenidas en Medio Mínimo Esencial de Eagle's (MEM) suplementado con HEPES, SFB al 8% para su crecimiento, 2% para el mantenimiento de los cultivos. Se incubaron a 37°C en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Para el mantenimiento de las líneas celulares, se retiró el medio de cultivo de a los frascos de 75 cm², se agregaron 2 ml de tripsina EDTA 0,025% (GIBCO) a la monocapa celular y se incubó a 37°C durante 5 minutos o hasta lograr el desprendimiento de la monocapa observable al microscopio invertido. Posteriormente, se agregaron 60 ml de medio de crecimiento y se aspiraron las células pipeteando suavemente. Finalmente, los pases de

células se realizaron en una relación 1:2 a 1:5 mediante el reemplazo del medio de cultivo por medio fresco, sin exceder los 10 pases posteriores al descongelamiento del stock de células.

La línea celular BHK-21 (ATCC Number: CCL-10) proviene de fibroblastos de riñón de hámster bebé (*Mesocricetus auratus*), son un tipo de células adherentes, no tumorigénicas. La línea celular fue mantenida en frascos de 75 cm² mantenida en Medio Mínimo Esencial de Eagle's (MEM) suplementado con HEPES, SFB 8% para su crecimiento, 2% para el mantenimiento de los cultivos. Se incubaron a 37°C en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular, se retiró el medio de cultivo de los frascos de 75 cm², se agregaron 2 ml de tripsina EDTA 0,025% (GIBCO) a la monocapa celular y se incubó a 37°C durante 5 minutos o hasta lograr el desprendimiento de la monocapa observable al microscopio invertido. Posteriormente, se agregaron 60 ml de medio de crecimiento y se aspiraron las células pipeteando suavemente. Finalmente, los pases de células se realizaron en una relación 1:2 a 1:5 mediante el reemplazo del medio de cultivo por medio fresco, sin exceder los 10 pases posteriores al descongelamiento del stock de células. Esta línea celular fue utilizada en los ensayos de placa para la titulación viral.

11.5. Aislamiento viral

Los sueros fueron diluidos en medio esencial mínimo de Eagle (E-MEM) en proporción 1/20, filtrados a través de membranas de 0,22 µm y posteriormente utilizados para la inoculación (200 µL) sobre cultivos de células C6/36. La fase de adhesión se llevó a cabo a 28°C durante 1 hora, momento en el cual se adicionaron 800 µl de E-MEM suplementado con 2% de SFB y HEPES. Posteriormente los cultivos se incubaron a 28°C en atmósfera al 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Los sobrenadantes de los aislamientos fueron colectados en el momento en que se observó efecto citopático por toda la monocapa o después de 10 días de infección en caso de no observar dicho efecto. Se realizó un segundo pase (inoculación de los sobrenadantes del primer intento de aislamiento) de aquellos aislamientos que no presentaron efecto citopático en el primer intento de aislamiento. Cada sobrenadante fue colectado, dividido en cuatro alícuotas y almacenado a -70°C.

11.6. Titulación mediante ensayo de placa

Para la titulación se utilizó el protocolo modificado previamente descrito por Usme-Ciro *et Al*. Se sembraron células BHK-21 en platos de 24 pozos, a razón de 300.000 células/pocillo mantenidas en MEM al 2% de SFB. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y 200 µl de diluciones seriadas de los sobrenadantes fueron inoculados desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-7} , cada una de ellas representada con tres réplicas y células sin inocular (Mock) fueron utilizadas como control negativo. Posteriormente, los platos fueron incubados a 37°C durante 1 hora, luego el inóculo fue retirado y se le agregaron 1,5 mL de MEM al 2% de FBS y 2% de carboximetilcelulosa de viscosidad media a cada pozo.

Los cultivos fueron incubados durante 8 días a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Finalmente, el medio fue retirado por inversión y los platos fueron fijados y teñidos con 1000µL de solución de tinción compuesta por formaldehído al 7% y cristal violeta al 0,4% diluido en etanol al 70% en proporción según lo requerido en cada ensayo. Los resultados de la titulación fueron expresados como unidades formadoras de placa (PFU, del inglés Plaque Forming Units) /ml y calculados mediante la fórmula: promedio del número de placas en la dilución X inverso de la dilución / volumen del inóculo inicial. El título viral obtenido mediante ensayo de placa (PFU/ml), fue utilizado para la estimación del volumen necesario para conseguirla multiplicidad de infección deseada (MOI 0,01), para elaborar las curvas de crecimiento.

11.7. Curvas de crecimiento de cepas de virus dengue

Cultivos de células Vero a una densidad de 75.000 células/pocillo fueron sembradas e incubadas por 24 horas a 37°C al cabo de lo cual fueron inoculados por triplicado a una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés: multiplicity of infection) de 0.01 (0.01 PFU/célula) en platos de 24 pocillos y mantenidos a 37°C durante 1 hora para permitir la adhesión de los virus de las cepas previamente tituladas. El cálculo se realizó mediante las fórmulas:

$75.000 \text{ células/pocillo} \times 21 \text{ (el número de pocillos a inocular)} = 1'575.000 \text{ células necesarias}$, luego, $1'575.000 \text{ PFU} = 1 \text{ MOI}$, luego cuantas células necesito infectar para obtener una MOI de 0,01. Entonces, $0,01 * 1'575.000/1 = 15.750$. Este valor multiplicado por

1000 μ L y dividido por el cálculo del título viral permitió determinar la cantidad en μ L de lote necesario para inocular 21 pozos de la placa de 24, los 3 pozos restantes fueron usados como control negativo.

Posteriormente, el inóculo fue retirado y se adicionaron 500 μ L de MEM con 2% de FBS. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y se colectaron tres alícuotas (200 uL, 200 uL y 100 uL) de los sobrenadantes de dichos cultivos a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas post-infección, las cuales fueron tituladas por ensayo de placa (mismo principio y metodología que el descrito previamente).

11.8. Inmunodetección de anticuerpos igM e igG específicos contra el dengue mediante pruebas ELISA de captura e indirecta

Con el objetivo de determinar si el paciente cursó con una infección primaria o una infección secundaria por DENV, se realizó la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas de ELISA IgM de captura e IgG de captura e indirecta, utilizando los estuches comerciales de PANBIO diagnostics (Cat. Numbers. 01PE20/01PE21, 01PE10 y 01PE30), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los niveles de IgM anti-dengue son detectables mediante ELISA IgM de Captura desde el 3º al 5º día post-infección y pueden permanecer hasta por 90 días en el suero de pacientes con los distintos cuadros clínicos de la enfermedad. Sus niveles llegan a ser máximos en infecciones primarias, mientras que en las infecciones secundarias son rápidamente reemplazados por los anticuerpos IgG de memoria.

El ensayo de ELISA IgG de Captura por su parte permite detectar niveles altos de anticuerpos tipo IgG que son característicos de una infección secundaria. A pesar de que la confirmación de infección por métodos serológicos requiere el procesamiento de muestras pareadas con un intervalo de tiempo de 6 a 15 días post infección, la totalidad de infecciones fueron confirmadas por métodos virológicos (aislamiento viral e inmunofluorescencia indirecta o RT-PCR), ya que por la naturaleza de la vigilancia virológica a partir de la cual deriva el presente estudio, no fue posible contar con una segunda muestra de suero en fase convalescente de los pacientes provenientes de los diferentes departamentos a nivel nacional, que permitiera evaluar seroconversión.

Para el análisis y la definición del estado inmune de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio con más precisión, se aplicaron los modelos descritos por Nguyen et al (81), basados en la interpretación de los resultados de ELISA IgG de Captura, ELISA IgG indirecta, así como la relación IgM/IgG de captura de acuerdo al periodo transcurrido desde el inicio de síntomas hasta la toma de muestra basados en algoritmos estadísticos diseñados por los autores para establecer las relaciones. En caso de discordancia entre los modelos, se definió el estado inmune de acuerdo a lo soportado por más de un modelo o de acuerdo al que presentara la mayor diferencia con respecto al punto de corte de cada modelo.

La totalidad de infecciones fueron confirmadas por métodos virológicos (aislamiento viral e inmunofluorescencia indirecta o RT-PCR), ya que por la naturaleza de la vigilancia virológica a partir de la cual deriva el presente estudio, no fue posible contar con una segunda muestra de suero en fase convaleciente de los pacientes provenientes de los diferentes departamentos a nivel nacional, que permitiera evaluar seroconversión.

11.9. Análisis estadístico.

Para el análisis se tomaron 28 muestras a pacientes, de los cuales se obtuvo la historia clínica para definir la patología de cada una de ellas con sus respectivas variables sociodemográficas. Para la caracterización de la población se realizó un análisis descriptivo de las variables de interés. Se estimaron frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas, las cuales se presentan en tablas de frecuencia; para las variables numéricas se calcularon medidas de tendencia central y dispersión. El supuesto de normalidad de los datos se evaluó con la prueba Shapiro Wilk. Si estas cumplían con el supuesto se calcularon medias y desviaciones estándar, de no ser normales se usaron las medianas y el rango intercuartílico (diferencia en el máximo y el mínimo valor del conjunto ordenado).

Se usaron las pruebas Chi cuadrado y Fisher para verificar la significancia estadística de la asociación entre las variables categóricas de las tablas de contingencia entre evento y clasificación contra cada uno de los síntomas.

Los resultados de la dispersión de la cinética en cada uno de los días fueron presentados en diagramas de caja, con 26 pacientes debido a que no se encontraron las expresiones

de cinética para el restante. Se revisó la homocedasticidad mediante el test de varianza, esta condición se probó dado que la homogeneidad de varianzas es una condición muy importante para realizar análisis de varianza (ANOVA) la cual se realizó y si se obtienen diferencias estadísticamente significativas. Se realizó la prueba de Tukey HSD para verificar entre qué grupos se encuentra la diferencia de medias.

Los análisis estadísticos fueron realizados considerando un nivel de error tipo I del 10% (confianza: 90%), utilizando el software estadístico R versión 3.6.0.

12. RESULTADOS

Aislamiento viral a partir de muestras cénicas derivadas de pacientes con sospecha de dengue

A través del estudio que soporta la presente investigación se llevó a cabo el procesamiento de 2961 muestras de suero, que constituyeron un total de 10804 intentos de aislamiento y derivaron en 82 aislamientos positivos para DENV, correspondientes a los serotipos DENV-1 a -4 (Tabla 1).

Tabla 1. Número de muestras de cada serotipo de DENV aisladas en el periodo 2010-2016.

| PERIODO DE MUESTREO | SEROTIPO* | | | | Total |
|----------------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | DENV-4 | |
| 2013-2014 | 2(0) | 14(7) | 0(0) | 1(0) | 17(7) |
| 2015-2016 | 7(0) | 31(14) | 27(8) | 0(0) | 65(22) |
| Total (%) | 9(0) | 45(21) | 27(8) | 1(0) | 82 (29) |

*En paréntesis se presenta el número de muestras por serotipo y año que fueron seleccionadas para el presente estudio.

Durante este periodo se observó la presencia de los 4 serotipos de DENV, con una asilación temporal en la frecuencia de cada uno de ellos, tal como puede ser observado en la Figura 1.

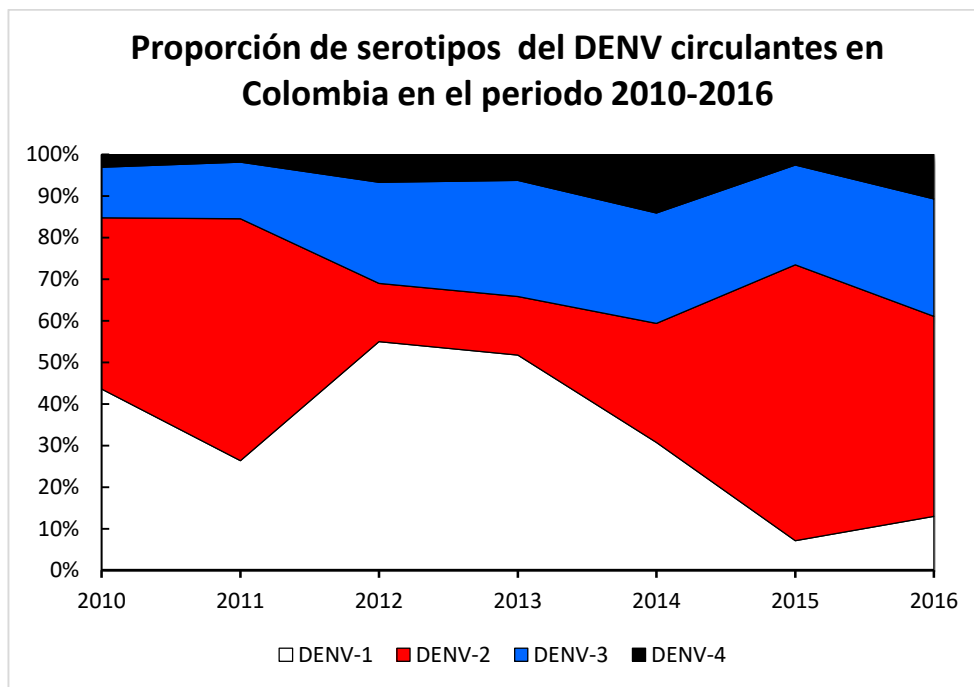


Figura 1. Co-circulación de los 4 serotipos de DENV en Colombia durante el periodo 2010-2016.

A partir de este conjunto de aislamientos se seleccionó una submuestra de 28 cepas cuyos títulos y formación de placas de lisis facilitaron la realización de curvas de crecimiento y por ende su caracterización in vitro de las mismas. Del total de muestras clínicas analizadas, el 75% (21 muestras) correspondieron al serotipo DENV-2 y el 25% (7 muestras) al serotipo DENV-3.

Siguiendo los parámetros de clasificación clínica de la OMS 2009 y guiados por el informe realizado por los profesionales de los diferentes centros de salud en el país en las fichas de notificación del Sivegila, clasificación clínica ajustada por el Sivegila e información anexa relacionada con las historias clínicas disponible en el Grupo de Virología INS, se llevó a cabo la clasificación clínica de los casos de la siguiente forma: DENV-2 (4 casos correspondieron a DG del periodo 2013-2016, sin embargo, no se concluye que hayan sido los únicos casos de dengue grave en este periodo en el país puesto que existen muchos inconvenientes con el transporte y posible manejo de las muestras que impiden un aislamiento viral exitoso, 4 casos adicionales correspondieron a DCSA y 13 correspondieron a DSSA. DENV-3 (3 casos correspondieron a DCSA y 4 casos correspondieron a DSSA. No se encontró ninguna muestra con presencia de DENV-3 con clasificación para DG (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Número de aislamientos de DENV provenientes de cada uno de los diferentes cuadros clínicos de la enfermedad, para el periodo 2013-2016.

| Serotipo | Cuadro clínico de la enfermedad* | | | Total |
|--------------|----------------------------------|--------------|-------------|---------------|
| | DSSA | DCSA | DG | |
| DENV-2 | 30 (13) | 9(4) | 6(4) | 45(21) |
| DENV-3 | 18(4) | 9(4) | 0(0) | 27(8)) |
| Total | 57(17) | 19(8) | 6(4) | 82(29) |

*En paréntesis se presenta el número de muestras por serotipo y año que fueron seleccionadas para el presente estudio.

Tabla 3. Listado de muestras de DENV 2 y 3 seleccionadas entre los años 2013-2016 con resultados positivos de aislamiento viral en células C6/36 clasificadas según ficha Sivigila.

| Serotipo | Aislamientos código | Año | Clasificación Clínica |
|----------|---------------------|------|-----------------------|
| DENV2 | 422041 | 2013 | DG |
| | 422641 | 2013 | DG |
| | 423887 | 2013 | DSSA |
| | 425334 | 2013 | DSSA |
| | 425817 | 2013 | DSSA |
| | 425819 | 2013 | DSSA |
| | 434321 | 2014 | DG |
| | 449308 | 2015 | DG - Mortal |
| | 449418 | 2015 | DCSA |
| | 449510 | 2015 | DSSA |
| | 449618 | 2015 | DSSA |
| | 450024 | 2015 | DCSA |
| | 450446 | 2015 | DSSA |
| | 450454 | 2015 | DCSA |
| | 450457 | 2015 | DCSA |
| | 450614 | 2015 | DSSA |
| | 450971 | 2015 | DSSA |
| | 450973 | 2015 | DSSA |
| | 451003 | 2015 | DSSA |
| | 451005 | 2015 | DSSA |
| 452018 | 2015 | DSSA | |
| DENV3 | 449241 | 2015 | DSSA |
| | 449255 | 2015 | DSSA |

| | | |
|--------|------|------|
| 449335 | 2015 | DCSA |
| 449683 | 2015 | DCSA |
| 449686 | 2015 | DSSA |
| 450397 | 2015 | DCSA |
| 459860 | 2015 | DSSA |

Distribución general de la muestra a nivel geográfico, virológico y clínico

Con respecto a las características clínicas de la enfermedad, la ficha Sivigila permitió obtener datos como: año de ocurrencia, lugar de procedencia, clasificación clínica del evento, edad y detalles de la clasificación por síntomas: fiebre, cefalea, dolor retro ocular, mialgias, altralgias, comezón, dolor abdominal, vómito, diarrea, somnolencia e irritabilidad, petequias, hipotensión, aumento de hematocrito, caída de plaquetas, acumulación de líquidos, hemorragia con compromiso, en algunos casos el informe aportó anexos como la historia clínica y algunos hallazgos de laboratorio que permitieron realizar la clasificación de la enfermedad según la Organización Mundial de la Salud (2009) como DSSA, DCSA y DG (Tabla 4).

Todos los casos de DG correspondieron a DENV-2, la media de edad para estos casos fue de 15,5 años, mientras que para los casos de DCSA en los dos serotipos fue de 33 años y para los casos de DSSA para los dos serotipos fue de 12 años (Tabla 4). Respecto a las manifestaciones clínicas de los pacientes con DG, todos presentaron fiebre y cefalea, sin embargo, el único caso reportado como mortal, presentó un cuadro clínico mucho más severo, caracterizado por sarpullido, vómito, diarrea, Hepatomegalia, aumento de hematocrito, acumulación de líquidos hemorragia con compromiso (éstas manifestaciones no se presentaron en ninguno de los otros tres casos), adicional, dolor abdominal, hipotensión, caída de plaquetas (Tabla 5).

Las manifestaciones clínicas no se asociaron significativamente con la clasificación final ajustada de los casos

Es importante anotar que la fecha de toma de muestra para análisis por laboratorio y remisión de la ficha de notificación y resumen de la historia clínica podría ser previa a la aparición de signos de alarma y en muchos casos es previa al desarrollo de la fase crítica y complicaciones propias del DG. La clasificación final ajustada fue tomada del Sivigila, con base en el seguimiento al desenlace clínico de los pacientes, por tal razón, las

manifestaciones clínicas que definen cada una de las clasificaciones no necesariamente muestran asociación directa con la clasificación final.

No se encontraron resultados estadísticamente significativos respecto a la presencia de ciertos síntomas o manifestaciones clínicas y la clasificación clínica final, sin embargo, es de resaltar que algunos síntomas como: somnolencia e irritabilidad, acumulación de líquidos y hemorragia con compromiso, solo hayan sido reportadas en los casos con Dengue grave, lo que podría sugerir una vinculación de éstas al estado de la enfermedad. De igual manera manifestaciones como hipotensión y petequias no aparecieron representadas en ninguno de los casos de Dengue Sin Signos de Alarma en ninguno de los dos serotipos (Tabla 5).

Un análisis similar se llevó a cabo para establecer si el serotipo infectante se asocia directamente con la aparición de alguno de los signos y síntomas. No se encontraron resultados estadísticamente significativos respecto a la presencia de ciertos síntomas o manifestaciones clínicas respecto a los serotipos 2 y 3, sin embargo, es de resaltar el síntoma de diarrea presenta asociación significativa al 90%. Los síntomas de somnolencia e irritabilidad, petequias, hipotensión, hepatomegalia, aumento de hematocrito, acumulación de líquidos y hemorragia con compromiso solo se presentaron en casos con DENV-2, la mayoría de estos relacionados con DG (Tabla 6).

Tabla 4. Distribución de casos según clasificación clínica por edad, departamentos y municipios reportados al sistema de vigilancia SIVIGILA.

| | DG (n=4) | DCSA (n=8) | DSSA (n=16) | Total | P valor CHI | P valor FISHER | |
|--------------------|-------------------|---------------|--------------|---------------|-------------|----------------|------|
| Edad (media - IQR) | 15,50 (14,0) | 33,00 (36,00) | 12,00(14,25) | 13,00 (23,25) | | | |
| Clasificación | | | | | | | |
| | DENV2 | 14,29% | 14,29% | 46,43% | 75,00% | 0,11 | 0,17 |
| | DENV3 | 0,00% | 14,29% | 10,71% | 25,00% | | |
| Departamento (%) | | | | | | | |
| | Antioquia | 0,00% | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | Bogotá | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | | |
| | Bolívar | 0,00% | 7,14% | 3,57% | 10,71% | | |
| | Boyacá | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | | |
| | Cauca | 3,57% | 0,00% | 0,00% | 3,57% | | |
| | Huila | 3,57% | 3,57% | 10,71% | 17,86% | | |
| | Meta | 7,14% | 0,00% | 0,00% | 7,14% | 0,14 | 0,37 |
| | Putumayo | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| | Quindío | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% | | |
| | Risaralda | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | | |
| | San Andrés - Isla | 0,00% | 0,00% | 7,14% | 7,14% | | |
| | Santander | 0,00% | 0,00% | 7,14% | 7,14% | | |
| | Tolima | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | | |
| Municipio (%) | | | | | | | |
| | Armenia | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% | | |
| | Belén de Umbría | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | | |
| | Bogotá | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% | 0,33 | 0,72 |
| | Campoalegre | 3,57% | 3,57% | 7,14% | 14,29% | | |
| | Falan | 0,00% | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | Hobo | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% | | |

| | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|--------|
| Honda | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% |
| Lebrija | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% |
| Medellín | 0,00% | 3,57% | 0,00% | 3,57% |
| Mercaderes | 3,57% | 0,00% | 0,00% | 3,57% |
| Oiba | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% |
| Orito | 0,00% | 0,00% | 7,14% | 7,14% |
| Puerto Asís | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% |
| Puerto Boyacá | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 7,14% |
| San Andrés Isla | 0,00% | 0,00% | 7,14% | 7,14% |
| Santa Rosa del Sur | 0,00% | 7,14% | 3,57% | 10,71% |
| Villavicencio | 7,14% | 0,00% | 0,00% | 7,14% |

Tabla 5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad, frecuencias de cada una respecto a la clasificación clínica de la enfermedad.

| | DG (n=4) | DCSA (n=8) | DSSA (n=16) | Total | P valor CHI | P valor FISHER |
|--------------------------|----------|------------|-------------|--------|-------------|----------------|
| Fiebre | | | | | | |
| Si (n=24) | 14,29% | 28,57% | 42,86% | 85,71% | | |
| No (n=1) | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% | 0,48 | 0,74 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Cefalea | | | | | | |
| Si (n=22) | 14,29% | 25,00% | 39,29% | 78,57% | | |
| No (n=3) | 0,00% | 3,57% | 7,14% | 10,71% | 0,52 | 0,82 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Dolor retroocular | | | | | | |
| Si (n=9) | 7,14% | 7,14% | 17,86% | 32,14% | | |
| No (n=16) | 7,14% | 21,43% | 28,57% | 57,14% | 0,49 | 0,70 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Mialgias | | | | | | |
| Si (n=17) | 7,14% | 25,00% | 28,57% | 60,71% | | |
| No (n=8) | 7,14% | 3,57% | 17,86% | 28,57% | 0,29 | 0,38 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Artralgias | | | | | | |

| | | | | | | |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| Si (n=14) | 7,14% | 14,29% | 28,57% | 50,00% | | |
| No (n=10) | 7,14% | 14,29% | 17,86% | 39,29% | 0,34 | 0,80 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Sarpullido | | | | | | |
| Si (n=4) | 3,57% | 0,00% | 10,71% | 14,29% | | |
| No (n=21) | 10,71% | 28,57% | 35,71% | 75,00% | 0,29 | 0,33 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Dolor abdominal | | | | | | |
| Si (n=7) | 7,14% | 10,71% | 7,14% | 25,00% | | |
| No (n=18) | 7,14% | 17,86% | 39,29% | 64,29% | 0,29 | 0,34 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Vomito | | | | | | |
| Si (n=11) | 3,57% | 17,86% | 17,86% | 39,29% | | |
| No (n=14) | 10,71% | 10,71% | 28,57% | 50,00% | 0,33 | 0,49 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Diarrea | | | | | | |
| Si (n=5) | 3,57% | 3,57% | 10,71% | 17,86% | | |
| No (n=20) | 10,71% | 25,00% | 35,71% | 71,43% | 0,56 | 0,82 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |

**Somnolencia
O
Irritabilidad**

| | | | | | | |
|-------------------------------|--------------|--------|--------|--------|-------------|-------------|
| Si (n=2) | 7,14% | 0,00% | 0,00% | 7,14% | | |
| No (n=23) | 7,14% | 28,57% | 46,43% | 82,14% | 0,00 | 0,03 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Petequias | | | | | | |
| Si (n=1) | 0,00% | 0,00% | 3,57% | 3,57% | | |
| No (n=6) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | 21,43% | 0,04 | 0,03 |
| Sin dato (n=21) | 3,57% | 28,57% | 42,86% | 75,00% | | |
| Hipotensión | | | | | | |
| Si (n=2) | 3,57% | 3,57% | 0,00% | 7,14% | | |
| No (n=23) | 10,71% | 25,00% | 46,43% | 82,14% | 0,24 | 0,21 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Hepatomegalia | | | | | | |
| Si (n=2) | 3,57% | 3,57% | 0,00% | 7,14% | | |
| No (n=23) | 10,71% | 25,00% | 46,43% | 82,14% | 0,24 | 0,21 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Aumento de hematocrito | | | | | | |
| | 0,00% | 3,57% | 0,00% | 3,57% | 0,30 | 0,41 |

| | | | | | | |
|---------------------------|--------------|--------|--------|--------|-------------|-------------|
| Si (n=1) | | | | | | |
| No (n=24) | 14,29% | 25,00% | 46,43% | 85,71% | | |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Caída de plaquetas | | | | | | |
| Si (n=10) | 7,14% | 25,00% | 3,57% | 35,71% | | |
| No (n=15) | 7,14% | 3,57% | 42,86% | 53,57% | 0,00 | 0,00 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Acumulación de líquidos | | | | | | |
| Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 0,00% | 3,57% | | |
| No (n=24) | 10,71% | 28,57% | 46,43% | 85,71% | 0,07 | 0,18 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |
| Hemorragia con compromiso | | | | | | |
| Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 0,00% | 3,57% | | |
| No (n=24) | 10,71% | 28,57% | 46,43% | 85,71% | 0,07 | 0,18 |
| Sin dato (n=3) | 0,00% | 0,00% | 10,71% | 10,71% | | |

Tabla 6. Manifestaciones clínicas de la enfermedad, frecuencias de cada una respecto a los serotipos 2 y 3 de la enfermedad.

| | | DENV2 (n=21) | DENV3 (n=7) | Total | P valor CHI | P valor FISHER |
|-------------------|-------------------|-----------------|----------------|--------|----------------|-------------------|
| Fiebre | Si (n=24) | 60,71% | 25,00% | 85,71% | 0,46 | 0,66 |
| | No (n=1) | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Cefalea | Si (n=22) | 53,57% | 25,00% | 78,57% | 0,28 | 0,42 |
| | No (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Dolor retroocular | Si (n=9) | 17,86% | 14,29% | 32,14% | 0,49 | 0,29 |
| | No (n=16) | 46,43% | 10,71% | 57,14% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Mialgias | Si (n=17) | 39,29% | 21,43% | 60,71% | 0,27 | 0,35 |
| | No (n=8) | 25,00% | 3,57% | 28,57% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Artralgias | Si (n=14) | 32,14% | 17,86% | 50,00% | 0,34 | 0,47 |
| | No (n=10) | 32,14% | 7,14% | 39,29% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Sarpullido | Si (n=4) | 10,71% | 3,57% | 14,29% | 0,56 | 0,79 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|--------|--------|--------|------|------|
| | No (n=21) | 53,57% | 21,43% | 75,00% | | |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Dolor abdominal | Si (n=7) | 14,29% | 10,71% | 25,00% | | |
| | No (n=18) | 50,00% | 14,29% | 64,29% | 0,32 | 0,42 |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Vomito | Si (n=11) | 21,43% | 17,86% | 39,29% | | |
| | No (n=14) | 42,86% | 7,14% | 50,00% | 0,12 | 0,15 |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Diarrea | Si (n=5) | 7,14% | 10,71% | 17,86% | | |
| | No (n=20) | 57,14% | 14,29% | 71,43% | 0,10 | 0,16 |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Somnolencia o irritabilidad | Si (n=2) | 7,14% | 0,00% | 7,14% | | |
| | No (n=23) | 57,14% | 25,00% | 82,14% | 0,36 | 0,74 |
| | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| Petequias | Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | No (n=6) | 21,43% | 0,00% | 21,43% | 0,21 | 0,26 |
| | Sin dato (n=21) | 50,00% | 25,00% | 75,00% | | |
| Hipotension | Si (n=2) | 7,14% | 0,00% | 7,14% | | |
| | No (n=23) | 57,14% | 25,00% | 82,14% | 0,36 | 0,74 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------|--------|--------|------|------|
| Hepatomegalia | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Si (n=2) | 7,14% | 0,00% | 7,14% | | |
| | No (n=23) | 57,14% | 25,00% | 82,14% | 0,36 | 0,74 |
| Aumento de hematocrito | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | No (n=24) | 60,71% | 25,00% | 85,71% | 0,46 | 0,66 |
| Caída de plaquetas | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Si (n=10) | 21,43% | 14,29% | 35,71% | | |
| | No (n=15) | 42,86% | 10,71% | 53,57% | 0,30 | 0,45 |
| Acumulación de líquidos | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | No (n=24) | 60,71% | 25,00% | 85,71% | 0,46 | 0,66 |
| Hemorragia con compromiso | Sin dato (n=3) | 10,71% | 0,00% | 10,71% | | |
| | Si (n=1) | 3,57% | 0,00% | 3,57% | | |
| | No (n=24) | 60,71% | 25,00% | 85,71% | 0,46 | 0,66 |

El 100% de casos de dengue grave presentaron infección secundaria por DENV

Mediante los ensayos de ELISA de Captura de IgM e IgG anti-dengue y ELISA indirecta de IgG anti-dengue de la casa comercial Panbio®, se evaluó el estado inmune de los pacientes incluidos en el estudio, aplicando los modelos descritos por Nguyen et al (81) (Tabla 6).

Según los resultados obtenidos para las pruebas de ELISA, el 100% (4/4) de las muestras con clasificación clínica de DG fueron producto de infecciones secundarias. De las 4 muestras de DENV-2 DCSA, dos presentaron infección secundaria y dos infecciones primarias según el análisis consenso. Mientras que para DENV-3 DCSA, el análisis mostró que tres de las cuatro muestras presentaban infección primaria y solo una correspondía a una infección secundaria. De las 13 muestras que pudieron ser evaluadas por ELISA de DENV-2 DSSA, 9 correspondieron a infecciones primarias, mientras que 4 correspondieron a infecciones secundarias. Las tres muestras de DENV-3 DSSA correspondieron a infecciones primarias (Tabla 6, Figura 2).

Tabla 6. Resultados de pruebas ELISA IgM, IgG indirecta y de captura y análisis según modelos descritos por Nguyen et al para todas las muestras analizadas.

| Código | Clasificación clínica | Días desde inicio de síntomas | Unidades PANBIO | | | | Estado inmune de acuerdo al modelo (Nguyen et al 2018) | Estado inmune (Consenso) | | | |
|--------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--|--------------------------|--------------------|------------------------------|--|
| | | | Dengue IgG Indirect ELISA | Dengue IgG Capture ELISA | Dengue IgM Capture ELISA | Panbio Capture IgM/IgG ratio | | Panbio Indirect IgG | Panbio Capture IgG | Interpretación IgM/IgG ratio | |
| 422041 | DG | 0 | 20,1 | 2,3 | 4,7 | 2 | Secundaria | Secundaria | Primaria | Secundaria | |
| 422641 | DG | 1 | 42,6 | 7,9 | 4,9 | 0,6 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |
| 434321 | DG | 1 | 33,6 | 4,7 | 4,9 | 1,1 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |
| 449308 | DG | 4 | 45,1 | 45,5 | 45,8 | 1 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |
| 449418 | DCSA | 2 | 40,2 | 14,3 | 7,9 | 0,6 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |
| 450024 | DCSA | NA | 42,7 | 57,4 | 189,1 | 3,3 | ND | ND | Primaria | Primaria | |
| 450454 | DCSA | 2 | 1,4 | 1 | 35,1 | 35,7 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 450457 | DCSA | 1 | 20,5 | 3,7 | 5,9 | 1,6 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |
| 423887 | DSSA | 2 | 22,3 | 0,9 | 13,4 | 14,5 | Secundaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 425334 | DSSA | 3 | 22 | 0,6 | 3,6 | 6 | Secundaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 425817 | DSSA | 2 | 11,2 | 0,4 | 11,3 | 25,4 | Secundaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 425819 | DSSA | 1 | 38 | 19,1 | 44,7 | 2,3 | Secundaria | Secundaria | Primaria | Secundaria | |
| 449510 | DSSA | 4 | 42,2 | 17,6 | 82,5 | 4,7 | Secundaria | Secundaria | Primaria | Primaria | |
| 449618 | DSSA | NA | 41,5 | 30,4 | 22,5 | 0,7 | ND | ND | Secundaria | Secundaria | |
| 450446 | DSSA | NA | 37,9 | 2,7 | 30,9 | 11,4 | ND | ND | Primaria | Primaria | |
| 450614 | DSSA | 1 | 2,5 | 0,6 | 25,6 | 44,6 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 450971 | DSSA | NA | 42,9 | 16,4 | 20,3 | 1,2 | ND | ND | Secundaria | Secundaria | |
| 450973 | DSSA | 1 | 5,2 | 0,4 | 5 | 11,5 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria | |
| 451003 | DSSA | 3 | 37,9 | 14,6 | 15,1 | 1 | Secundaria | Secundaria | Secundaria | Secundaria | |

| | | | | | | | | | | |
|--------|------|----|------|------|-------|------|------------|------------|------------|------------|
| 451005 | DSSA | 6 | 41,9 | 21,1 | 125,6 | 6 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria |
| 452018 | DSSA | 2 | 33,4 | 6,3 | 25,3 | 4 | Secundaria | Secundaria | Primaria | Primaria |
| 449335 | DCSA | 4 | 36,5 | 20,7 | 70,1 | 3,4 | Secundaria | Secundaria | Primaria | Primaria |
| 449683 | DCSA | 4 | -0,9 | 1,9 | 6,3 | 3,2 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria |
| 449982 | DCSA | 4 | 21,5 | 0,9 | 49,6 | 56,6 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria |
| 450397 | DCSA | NA | 36,3 | 17,7 | 13,4 | 0,8 | ND | ND | Secundaria | Secundaria |
| 449241 | DSSA | 4 | 22,6 | 0,7 | 18,4 | 24,9 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria |
| 449255 | DSSA | 3 | 19,8 | 0,4 | 6,7 | 16,5 | Secundaria | Primaria | Primaria | Primaria |
| 449686 | DSSA | 3 | 2,4 | 1,4 | 4 | 2,8 | Primaria | Primaria | Primaria | Primaria |

Tabla 7. Consolidado de resultados del estado inmune de la infección por DENV (primaria o secundaria)

| Clasificación clínica | Primaria | % | Secundaria | % | ND | % | Total |
|-----------------------|----------|------|------------|------|----|-----|-----------|
| DSSA | 12 | 40 | 4 | 13,3 | 0 | 0 | 16 |
| DCSA | 5 | 16,7 | 3 | 10,0 | 0 | 6,7 | 8 |
| DG | 0 | 0 | 4 | 13,3 | 0 | 0 | 4 |

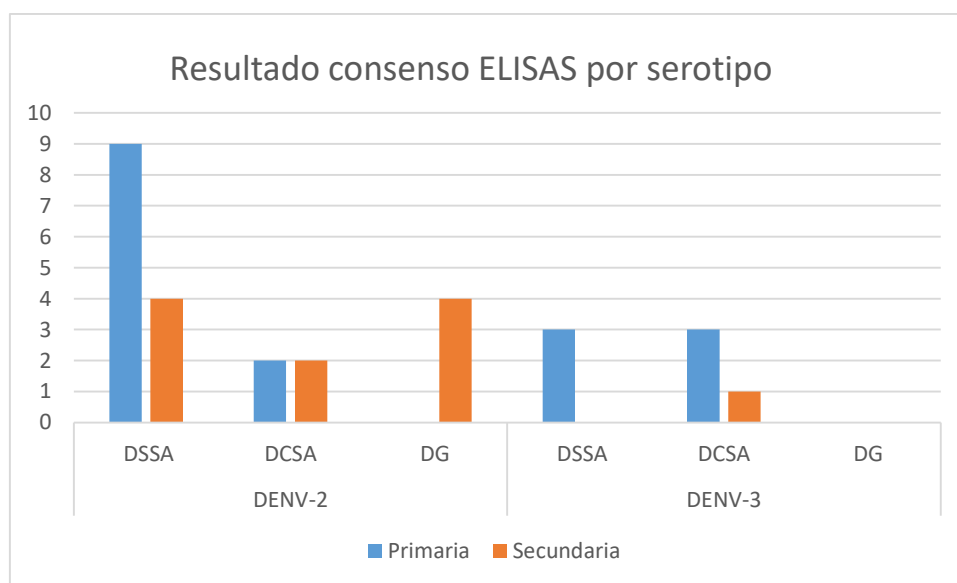


Figura 2. Resultados consenso de pruebas de las pruebas de ELISA por serotipo DENV2 y DENV3 respecto al estado inmune de la infección (infección primaria o secundaria con respecto a su clasificación clínica (DSSA, DCSA o DG).

Las cinéticas de replicación del DENV no se correlacionan con la clasificación clínica de los casos

La evaluación de la cinética de crecimiento de cada cepa se realizó a partir de lotes virales obtenidos luego del aislamiento viral en cultivos de células C6/36 (Figura 3), seguidos de ensayos de titulación viral en células BHK-21 para por último ser evaluadas mediante curvas de crecimiento en células Vero (Figura 4) a una MOI de 0,01 unidades formadoras de placa/célula.

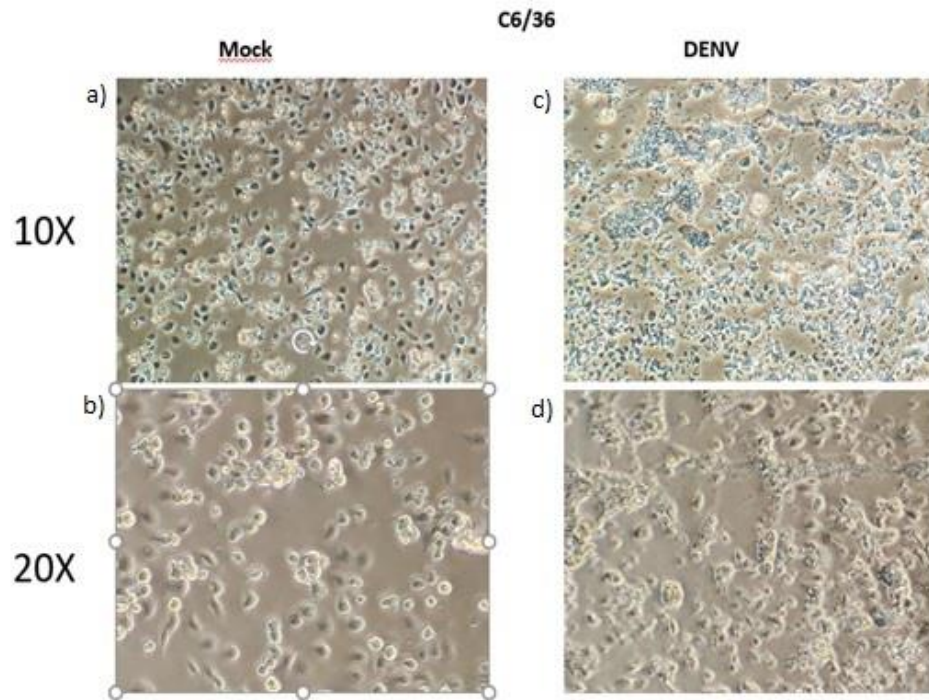


Figura 3. Cultivos de células C6/36. A1: mock, cultivo de células C6/36 vistas al microscopio a un objetivo 10X, b1 cultivo de células C6/36 infectadas con DENV vistas al microscopio a un objetivo de 10X. a2: mock, cultivo de células C6/36 vistas al microscopio a un objetivo 20X, b2: cultivo de células C6/36 infectadas con DENV vistas al microscopio a un objetivo de 20X.

+

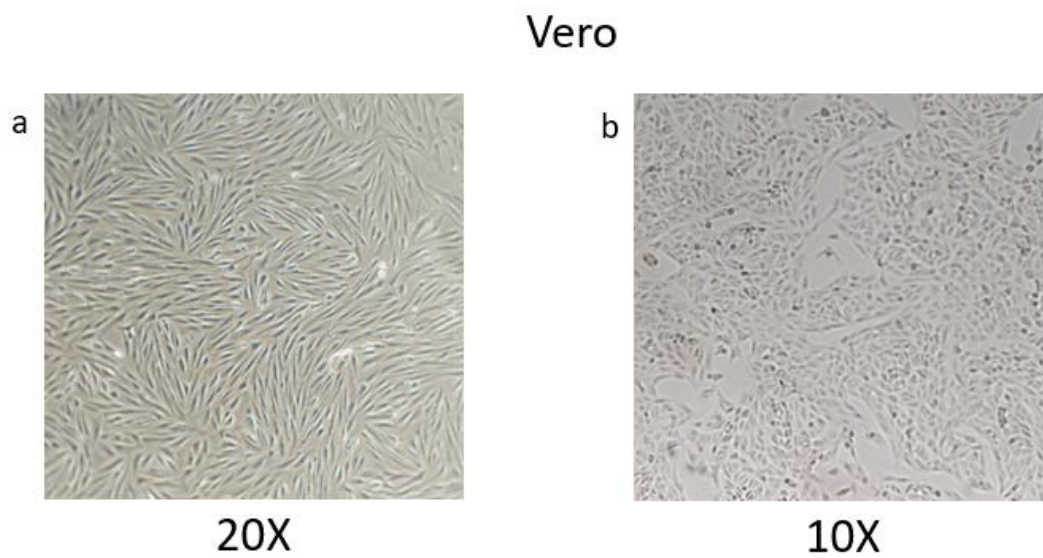


Figura 4. Cultivo de células BHK-21. A: cultivo de células Vero vistas al microscopio a un objetivo 20X. b: cultivo de células Vero vistas al microscopio a un objetivo 10X.

En la Figura 5 se muestra la cinética de crecimiento entre las diferentes clasificaciones clínicas de la enfermedad: DSSA, DCSA y DG mostrando una diferencia de crecimiento de las cepas de DENV-2 DG respecto a DCSA y DSSA que presenta una tendencia a un menor título viral respecto a las otras dos, sin un crecimiento acelerado en el tiempo. Mientras que el DCSA muestra un crecimiento viral más acelerado respecto a DSSA y DG sin mostrar un punto de descenso.

La Figura 6 muestra las curvas de crecimiento de DENV-3 DSSA y DENV-3 DCSA, sin embargo, en estas no se evidencia una diferencia en la cinética de crecimiento viral entre las dos clasificaciones clínicas de la enfermedad (DSSA y DCSA).

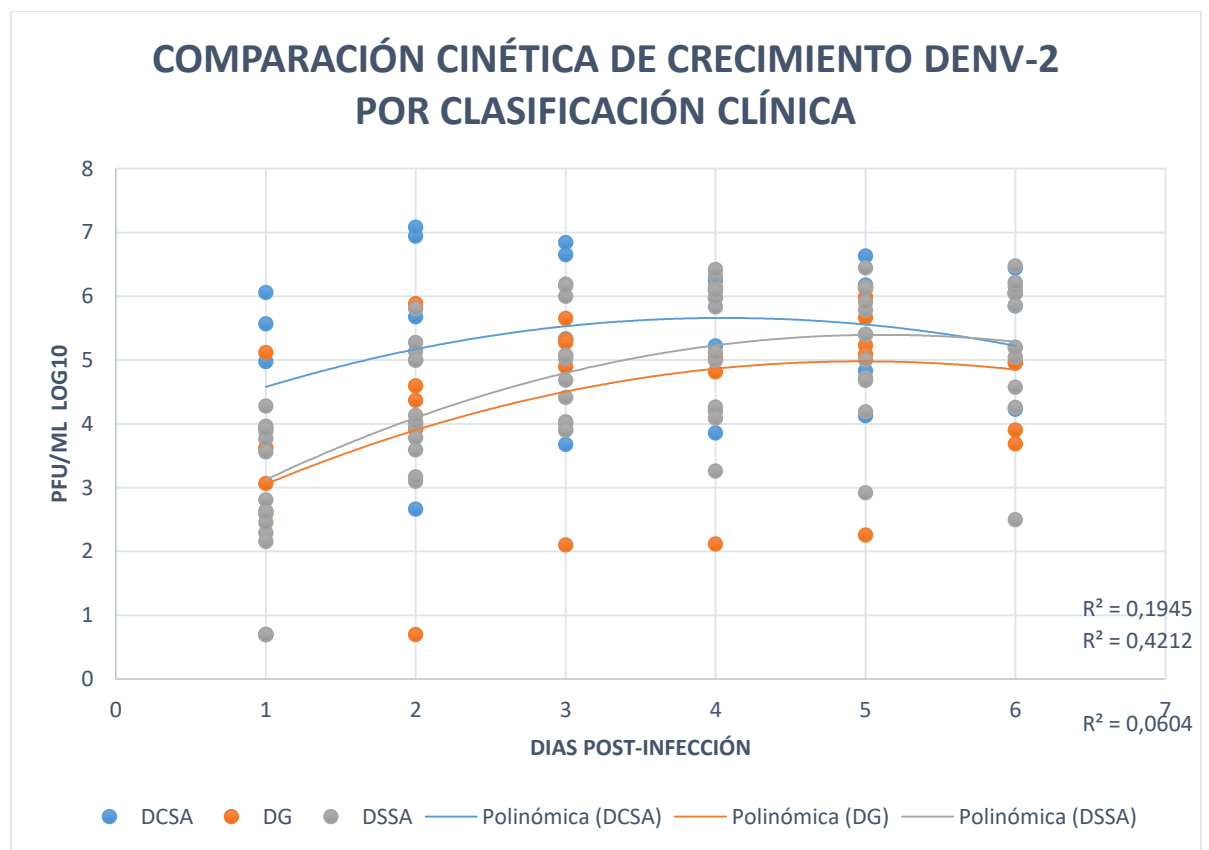


Figura 5. Comparación entre resultados de las cinéticas de crecimiento de las cepas de DENV-2 agrupadas por clasificación clínica respecto a los días post-infección.

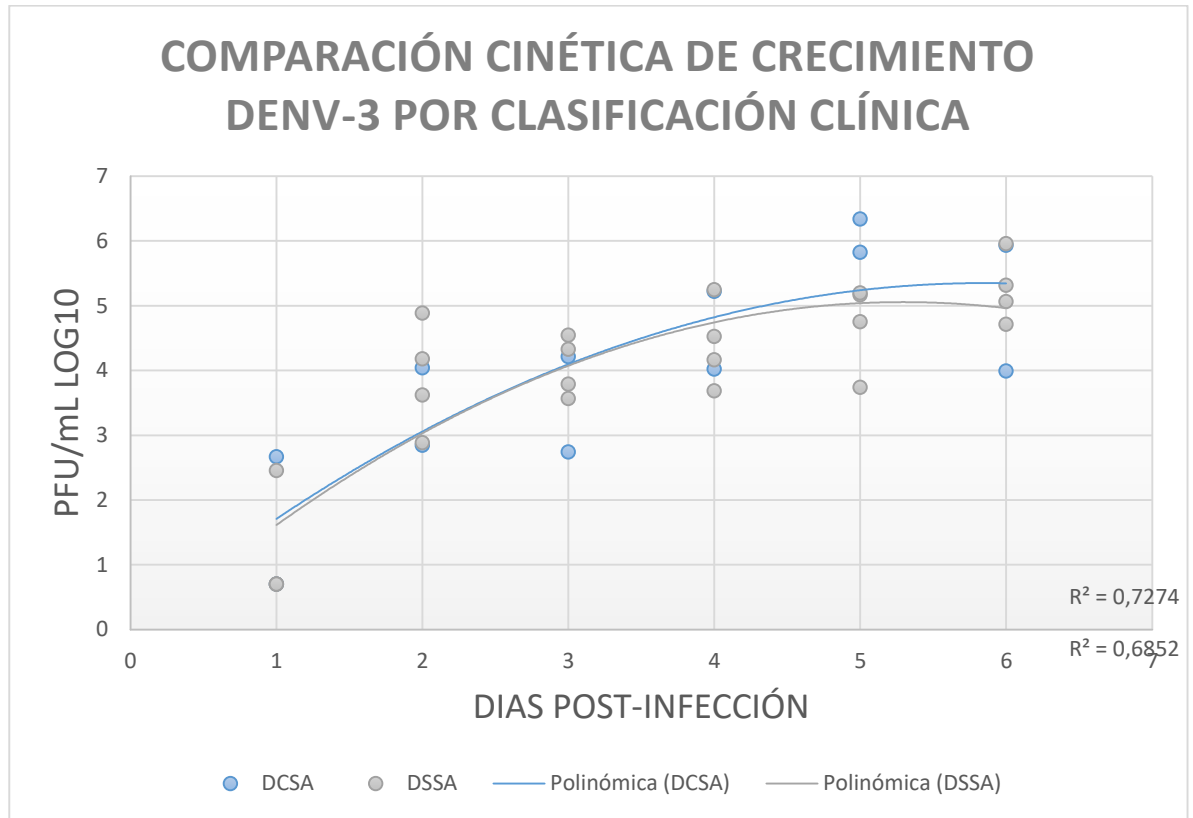


Figura 6. Comparación entre resultados de las cinéticas de crecimiento de las cepas de DENV-3 agrupadas por clasificación clínica respecto a los días post-infección.

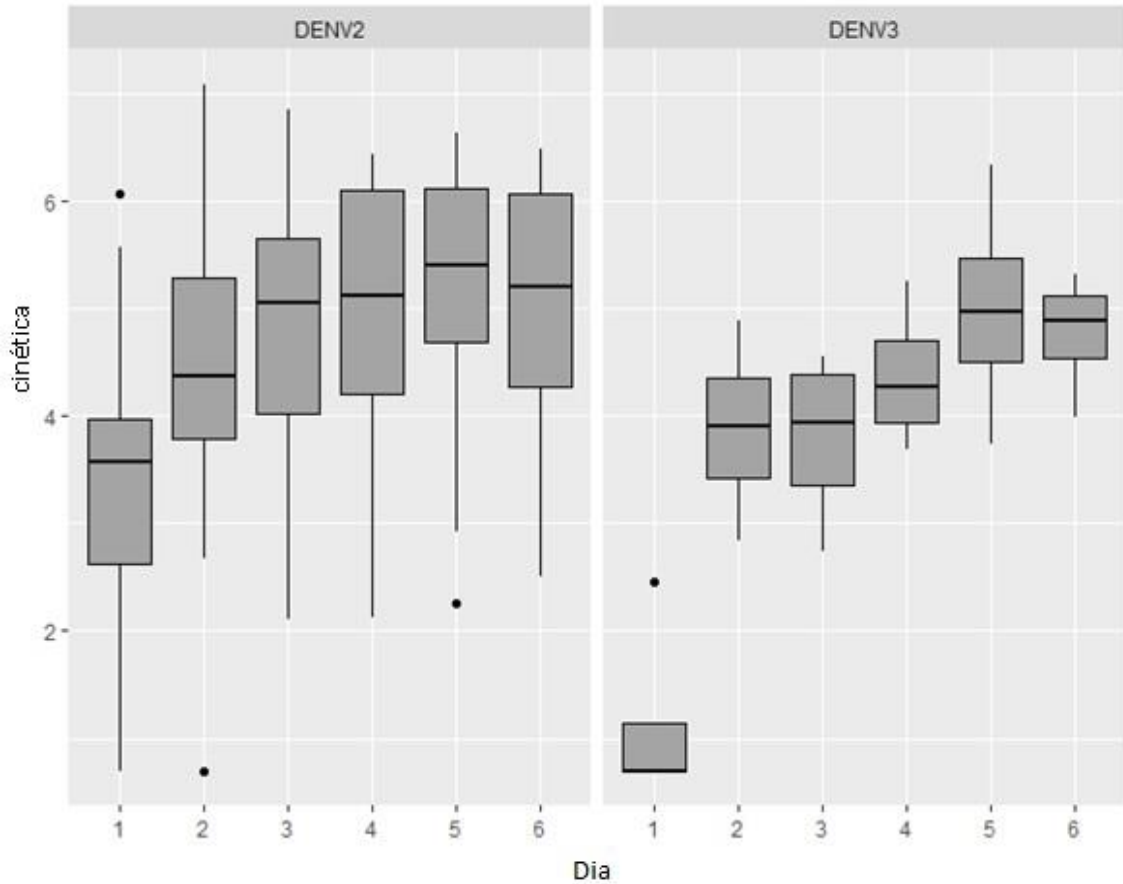


Figura 7. Cinética por día para cada serotipo (2 y 3).

En la figura 7 se observa que los valores de la expresión son mayores para el serotipo 2 comparado con el serotipo 3. El serotipo 2, el 50% de los datos es menor de 3.56 para el día 1, en el día 2 de 4.37, en el día 3 de 5.05, en el día 4 de 5.11, en el día 5 de 5.40 y en el día 6 de 5.19; se observa que para desde el día 2 hasta el 6 el comportamiento de los datos en relación a su dispersión no presenta diferencias. Con relación al serotipo 3, el 50% de los datos es menor de 1.57 para el día 1, en el día 2 de 4.08, en el día 3 de 4.28, en el día 4 de 4.87, en el día 5 de 4.95 y en el día 6 de 5.18; se observa que para estos valores tienen tendencia al crecimiento y al día 6 los dos serotipos tienen la misma distribución en relación a la mediana, a pesar de que la dispersión para el serotipo 3 es menor en cada uno de los días.

Las coinfecciones DENV-DENV, DENV-CHIKV fueron más frecuentes durante el pico epidémico de CHIKV en 2015.

El período de muestreo coincidió con los picos epidémicos de CHIKV y posteriormente de ZIKV, lo cual, sumado a la circulación hiperendémica de DENV conllevó a la identificación de algunos casos de coinfecciones a nivel nacional y como resultado de la emergencia por la propagación de ZIKV y CHIKV, en los últimos años del período muestreado, se evidenció una coinfección de virus DENV en 4 muestras: DENV-CHIKV en tres de las muestras y DENV-DENV en una de las muestras (Tabla 8).

Tabla 8. Identificación de coinfecciones entre serotipos de DENV y DENV-CHIKV en pacientes con DSSA y DCSA durante el año 2015.

| Número | Código de muestra | Coinfección | Clasificación clínica |
|--------|-------------------|-------------|-----------------------|
| 1 | 449618 | DENV2-CHIKV | DSSA |
| 2 | 450024 | DENV2-DENV3 | DCSA |
| 3 | 450454 | DENV2-CHIKV | DCSA |
| 4 | 450457 | DENV2-CHIKV | DCSA |

DENV-2 estuvo presente en el 100% de las coinfecciones identificadas, lo cual coincide con su mayor circulación durante el año 2015. Asimismo, es importante resaltar que de los cuatro casos de infección por DENV-2 clasificados como DCSA, el 75% (3 casos) correspondieron a coinfecciones con DENV-3 o CHIKV. Ninguno de los casos de coinfección fue clasificado como DG.

Es de notar que tres de los casos de coinfecciones correspondieron a pacientes menores de 15 años. El paciente número 1 con código 449618 tiene 13 años y según el reporte del Sivigila presentó DSSA, no reporta ninguna característica clínica sobresaliente. El paciente 2 con código 450024 es un paciente de 5 años de edad, con clasificación clínica de DCSA, tampoco hay reporte de ninguna característica clínica sobresaliente. El tercer paciente identificado con código interno 450024 es un paciente de 43 años de edad con clasificación clínica de DCSA proveniente de una infección primaria. Por último, el paciente #4 con código 45044 tiene clasificación final como DCSA y corresponde a un menor de 2 meses de edad.

13. DISCUSIÓN

En Colombia, luego de la reemergencia de los 4 serotipos de DENV durante los años 70's y principios de los 80's (66), se ha dado un reemplazo cíclico de serotipos (22), genotipos

(78) e incluso linajes genéticos (2), siendo los serotipos DENV-1 y DENV-2 los de mayor prevalencia en el periodo de 1971 a 2010 y responsables de las mayores epidemias durante el siglo XX. DENV-3 circuló por un espacio corto de tiempo durante los años 70s y tras un período de ausencia de registro de circulación, se detectó nuevamente a inicios del año 2002, reintroducido durante la epidemia 2001-2002, que se caracterizó por una alta incidencia de dengue y dengue grave, así como elevada mortalidad por esta causa(66). (22,79). Para el periodo 2010-2016, los resultados obtenidos del muestreo general en el estudio que soporta la presente investigación mostraron una co-circulación de serotipos a nivel nacional, con una oscilación en la frecuencia de cada uno de los serotipos a través del tiempo y predominio diferencial de serotipos durante las epidemias (Figura 1).

En la recolección de muestras para este estudio se obtuvo un porcentaje mayor de muestras de los serotipos DENV-2 75% (21 muestras) seguido del serotipo DENV-3 25% (7 muestras), mientras que de los serotipos DENV-1 y -4 se obtuvo un número muy bajo de aislamientos (Tabla 1), razón por la cual se continuó con la caracterización fenotípica in vitro de cepas de los serotipos más prevalentes (DENV-2 y -3), que permitieran realizar el análisis más robusto de los datos.

Los cuatro casos de DG incluidos en el presente estudio correspondieron a DENV-2 y el análisis serológico sugirió que todos ellos correspondieron a infecciones secundarias. De estos casos analizados de DG, uno tuvo un desenlace fatal. Este hallazgo es de gran relevancia y se suma a las evidencias en favor del componente inmunológico como principal determinante en el desarrollo del dengue grave. Entre las múltiples hipótesis que intentan explicar la patogénesis del dengue grave, la que ha sido históricamente más aceptada en la potenciación mediada por anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés) (9). A pesar de que no es posible excluir a los demás serotipos como potenciales causantes de la enfermedad grave, y que la tasa de aislamiento en general fue muy baja, nuestros resultados soportan la hipótesis de una mayor severidad asociada a DENV-2, así como una mayor severidad asociada a infecciones secundarias en las cuales el DENV-2 es el segundo serotipo en infectar.

El presente estudio presenta evidencias a nivel epidemiológico en favor de esta hipótesis y justifica por ende la necesidad de avanzar en métodos serológicos que permitan reconocer

de forma rápida el estado inmune y antecedentes de infecciones previas de los pacientes como un insumo fundamental para el pronóstico de la enfermedad.

Otros estudios como los publicados por Suharti, C., et al, Bethell, D.B., et al. y Diamond, M.S., et al, afirman que una infección secundaria predispone para el desarrollo de DG, respaldados en la teoría ADE, que basados en ensayos *in vitro* y estudios epidemiológicos que relacionan una infección secundaria por un serotipo de DENV heterólogo (aquel distinto al de la primera infección) con enfermedad grave. La teoría se encuentra basada en que en una infección primaria se generan anticuerpos neutralizantes contra el serotipo infectante, pero también, anticuerpos no neutralizantes que reaccionan contra serotipos heterólogos. Estos últimos anticuerpos maximizan una subsecuente infección con un serotipo heterólogo, al potenciar la entrada del virus mediante receptores Fc- γ en monocitos y macrófagos, logrando no solo un mayor número de células infectadas, sino un aumento en la replicación del virus en su célula blanco y, como consecuencia, un aumento en la producción de mediadores que incrementan la permeabilidad vascular (54–56).

En un estudio realizado por Saroch A, et.al en 2017 sobre factores clínicos y de laboratorio asociados a mortalidad en una cohorte de 16 pacientes con desenlace fatal por DENV, se encontró que factores como alteraciones sensoriales, niveles más bajos de hemoglobina y hematocrito, creatinina sérica más alta, transaminasa sérica más alta y niveles más bajos de albúmina sérica, se asocian significativamente con la mortalidad por dengue (82). En el presente estudio, no se encontró asociación estadísticamente significativa de algún síntoma con el desenlace clínico de la enfermedad, sin embargo, con una confianza estadística del 90% el síntoma diarrea se reportó como asociado. Adicionalmente, los síntomas somnolencia e irritabilidad, petequias, hipotensión, hepatomegalia, aumento de hematocrito, acumulación de líquidos y hemorragia con compromiso se presentaron únicamente en casos con DENV-2, esto puede constituir un complemento a los resultados suministrados por los autores, sin embargo es importante resaltar la importancia que tiene el realizar notificaciones completas de los casos para lograr acceder a este tipo de datos y realizar análisis completos, de calidad y oportunos que beneficien a la comunidad. La identificación de estos parámetros de manera temprana en el curso de la enfermedad debe impulsar la pronta intensificación del tratamiento en casos de dengue.

Respecto a la asociación de ciertas manifestaciones clínicas con la severidad de la enfermedad, en este estudio no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, sin embargo, fue de notar que síntomas como somnolencia e irritabilidad, petequias, hipotensión, hepatomegalia, aumento de hematocrito, acumulación de líquidos y hemorragia con compromiso estuvieron presentes solo en casos con DENV-2. Rojas et.al (83) estudiaron los indicadores clínicos de Dengue mortal en dos áreas endémicas de Colombia, encontrando que el síntoma de alteración de la conciencia está relacionado con casos fatales de dengue, lo que concuerda con síntomas como somnolencia e irritabilidad observados aquí, adicionalmente reportan otros como incremento en la edad, dificultad respiratoria, ictericia y aumento de la frecuencia cardiaca. Así mismo los autores determinaron una presión arterial sistólica más baja, lo que concuerda por lo descrito en este estudio, en donde el síntoma hipotensión sólo fue encontrado en pacientes con DENV-2, asociado a desarrollar con mayor frecuencia DG (83).

13.1. Coinfecciones DENV-CHIKV durante la epidemia de CHIKV

La circulación simultánea de DENV, ZIKV y CHIKV, ha sido documentada en muchas regiones del mundo, además éstas tienen similares presentaciones clínicas (84). En Colombia para el período epidémico de ZIKV en Colombia (octubre de 2015-diciembre 2016) fueron procesadas 23871 muestras por el Instituto Nacional de Salud, de éstas, 34 (0,14%), correspondieron a coinfecciones de los virus DENV, ZIKV y CHIKV, la coinfección CHIKV-ZIKV fue la más prevalente con 28 casos (82,3%), seguida por DENV-CHIKV (8,8%) y DENV-ZIKV (8,8) con 3 casos cada una. Sobre los serotipos documentados de DENV con coinfección, todos presentaron DENV-3 en los casos de coinfección DENV-CHIKV y la media de edad para todos los casos de coinfección fue de 28 años (63), a diferencia de lo encontrado en las muestras utilizadas en este estudio, donde los 4 casos fueron de menores de 15 años (63).

De los 4 casos de coinfecciones descritos en el presente estudio (Tabla 8. Identificación de coinfecciones.), 3 correspondieron a coinfección DENV-CHIKV, todos los casos de DENV correspondieron al serotipo 2, concordante con una mayor frecuencia de este serotipo durante el 2015 (Figura 8. Co-circulación de los 4 serotipos.). Nuestros datos no pueden ser concluyentes claro está, debido a la poca cantidad de muestras, sin embargo, es un

hallazgo descriptivo de relevancia, dado que el 75% de casos de DENV-2 clasificados como DCSA correspondieron a coinfecciones con DENV-3 o CHIKV.

13.2. Cinética de crecimiento.

Los mecanismos moleculares relacionados con la patogénesis del dengue grave y los factores virales y del huésped que contribuyen a su progresión, están lejos de ser bien entendidos aún. Factores del huésped tales como la edad, el género, estado nutricional y genética, son parámetros conocidos de la enfermedad. Además, infecciones previas por DENV y anticuerpos maternos parecen interferir en el resultado de una infección en curso (70,85,86). Datos epidemiológicos indican, sin embargo, que factores virales, podrían influir también en el resultado de la enfermedad y que la virulencia difiere entre cepas de DENV, incluso entre cepas del mismo serotipo (67,75,76).

Un estudio realizado por Vaughn D. et.al (73), determinó que pacientes entre 18 meses y 14 años de edad, con infecciones de DENV-2 tenían cuadros de la enfermedad más severos que aquellos que habían sido infectados con los otros serotipos y encontraron también relación de DG con infección secundaria. Esto concuerda con lo encontrado en este estudio, en donde las cuatro muestras de pacientes reportadas como DG pertenecían al DENV-2 y además correspondían a una infección secundaria. Esto corrobora una relación entre infección secundaria y el desarrollo de formas graves de la enfermedad.

La cinética de replicación fue evaluada mediante el aislamiento viral en células C6/36 y curvas de crecimiento viral realizadas en células Vero. Éstas dos líneas celulares han sido utilizadas en algunas metodologías reportadas en otros estudios para replicar la cinética del virus dengue (10,74). Respecto a las propiedades fenotípicas de las diferentes cepas de las diferentes clasificaciones clínicas, DENV-2 DG mostró un comportamiento diferente respecto a DENV-2 DSSA y DCSA, ya que mostró una cantidad menor de PFUs y sin una aceleración en el tiempo; sin embargo, es de notar que harían falta mediciones con un número mayor de cepas para corroborar el presente hallazgo donde se demuestra que no existen diferencias entre las cinéticas de crecimiento de los grupos definidos de acuerdo a la clasificación clínica. Así mismo, se plantea la utilización de líneas celulares derivadas de células humanas, especialmente aquellas que han sido reconocidas como blancos de la

infección, tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas, así como blancos secundarios de la infección tales como las células endoteliales, hepatocitos y neuronas.

CONCLUSIONES

- El presente estudio permitió reconocer la presencia exclusiva de DENV-2 en los casos de DG incluidos en el estudio.
- Se encontró ocurrencia de infecciones secundarias en el 100% de los casos de dengue grave.
- A pesar de que no fue posible establecer una correlación entre las curvas de crecimiento y el desenlace clínico de la enfermedad, se sugieren algunas diferencias en las cinéticas que podrían ser reconocidas en futuros estudios mediante el uso de líneas celulares humanas susceptibles y permisivas a la infección por DENV.
- Adicionalmente, se evidenció la presencia de coinfecciones en el año 2015, coincidente con el pico epidémico de CHIKV y mayor frecuencia de circulación del DENV-2. El 75% de los casos de DENV-2 clasificados como DCSA correspondieron a co-infecciones con DENV-3 o CHIKV.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. (OMS) OM de la S. Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La paz, Bolivia; 2009. p. 152.
2. Laiton-Donato K, Alvarez DA, Peláez-Carvajal D, Mercado M, Ajami NJ, Bosch I, et al. Molecular characterization of dengue virus reveals regional diversification of serotype 2 in Colombia. *Virology* [Internet]. 2019/05/08. 2019;16(1):62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31068191>
3. Zambrano B, San Martín JL. Epidemiology of Dengue in Latin America. *J Pediatr Infect Dis Soc* [Internet]. 2014/08/02. 2014;3(3):181–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26625380>
4. Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2012;87(4):584–93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042846>
5. (OMS) WHO. DENGUE BULLETIN. Vol. 36. New Delhi, India; 2012.
6. Salud/ OP de la, salud O mundial de la. Actualización epidemiológica: Dengue. 22 de junio de 2019. Washington, D.C.; 2019.
7. Salud IN de. Boletín epidemiológico Semanal. Vol. 17. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2019.
8. Usme-Ciro JA, Méndez JA, Laiton KD, Páez A. The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2014/11/19. 2014;10(9):2674–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483495>
9. Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. *F1000Res* [Internet]. 2015/11/25. 2015;4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918141>
10. Tuiskunen A, Monteil V, Plumet S, Boubis L, Wahlström M, Duong V, et al. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Arch Virol*. 2011;
11. Mores CN, Christofferson RC, Davidson SA. The role of the mosquito in a dengue human infection model. *J Infect Dis*. 2014;
12. Bhatia R, Dash AP, Sunyoto T. Changing epidemiology of dengue in South-East Asia. *WHO South East Asia J Public Heal* [Internet]. 2013;2(1):23–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28612819>
13. M., Murray N, MB Q, A W-S. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013;5:299–309.
14. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):504–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266>
15. WHO-SEARO, WHO-WPRO. The Dengue Strategic Plan for the Asia Pacific Region. Ginebra; 2015. p. 49. (http://www.wpro.who.int/mvp/Dengue_Strategic_Plan.pdf?ua=1).

16. Guo C, Zhou Z, Wen Z, Liu Y, Zeng C, Xiao D, et al. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990-2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017/07/12. 2017;7:317. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748176>
17. Amarasinghe A, Kuritsk JN, Letson GW, Margolis HS. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011;17(8):1349–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801609>
18. Ayolabi CI, Olusola BA, Ibemgbo SA, Okonkwo GO. Detection of Dengue viruses among febrile patients in Lagos, Nigeria and phylogenetics of circulating Dengue serotypes in Africa. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019/07/02. 2019;75:103947. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31276800>
19. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* [Internet]. 2014/01/24. 2014;22(3):138–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468533>
20. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010;82(1):128–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065008>
21. E. GRS. Informe del Evento Dengue Colombia, 2017. 3rd ed. Instituto Nacional de Salud; 2018.
22. Padilla JC, Rojas DP, Sanchez-Gomez R. Dengue en Colombia: Epidemiología de la reemergencia y la hiperendemia . Primera ed. editor. Los Autores, 2012. p. 249.
23. Carabali M, Hernandez LM, Arauz MJ, Villar LA, Ridde V. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. *BMC Infect Dis*. 2015;
24. Carrillo-Hernández MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gómez-Rangel SY, Martínez-Gutierrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018/01/30. 2018;18(1):61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29382300>
25. Salud IN de. Boletín epidemiológico semanal. Vol. 52. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2018.
26. OPS/OMS OP de la S. Dengue and dengue haemorrhagic fever [Internet]. [cited 2019 Sep 1]. Available from: https://www.paho.org/sur/index.php?option=com_content&view=article&id=166:dengue-dengue-haemorrhagic-fever&Itemid=371
27. OPS/OMS OP de la S. Dengue: Información general [Internet]. [cited 2019 Sep 1]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4493:2010-informacion-general-dengue&Itemid=40232&lang=es
28. Amemiya T, Gromiha MM, Horimoto K, Fukui K. Drug repositioning for dengue haemorrhagic fever by integrating multiple omics analyses. *Sci Rep* [Internet].

- 2019/01/24. 2019;9(1):523. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679503>
29. Xu HT, Colby-Germinario SP, Hassounah SA, Fogarty C, Osman N, Palanisamy N, et al. Evaluation of Sofosbuvir (β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017/07/24. 2017;7(1):6345. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28740124>
 30. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med* [Internet]. 2014/11/03. 2015;372(2):113–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25365753>
 31. Aguiar M. Dengue vaccination: a more ethical approach is needed. *Lancet* [Internet]. 2018;391(10132):1769–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29739559>
 32. Halstead SB. Dengue. *Lancet* [Internet]. 2007;370(9599):1644–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993365>
 33. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* [Internet]. 2004;189(8):1411–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073678>
 34. RM A, J RV. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLOS pathogen*. 2013. p. 1–4. ([http://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003551](http://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003551&type=printable) &type=printable; vol. 9).
 35. Education N. Dengue fever [Internet]. [cited 2019 Sep 1]. Available from: <https://www.nature.com/wls/ebooks/dengue-fever-22453392/contents/>
 36. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009;22(4):564–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822889>
 37. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Heal* [Internet]. 2012;32 Suppl 1:5–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22668442>
 38. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *J Virol*. 2005;
 39. Bente DA, Melkus MW, Garcia J V., Rico-Hesse R. Dengue Fever in Humanized NOD/SCID Mice. *J Virol*. 2005;
 40. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *J Virol*. 2006;
 41. I K, T T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol*. 2001;11(5):301–11.
 42. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* [Internet]. 2001;75(16):7769–73. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11462053>

43. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(25):23698–708. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855154>
44. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* [Internet]. 2003;4(7):723–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783086>
45. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(7):823–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682107>
46. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* [Internet]. 1997;3(8):866–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256277>
47. Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* [Internet]. 1999;257(1):156–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208929>
48. Muñoz-Jordán JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;
49. Castillo Ramirez JA, Urcuqui-Inchima S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2015.
50. Castro-Mussot ME, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Salazar MI. [Immune responses and immunopathogenesis in infections with dengue virus]. *Gac Med Mex* [Internet]. 2013;149(5):531–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108339>
51. O S-SMIL-O, M P-G, C M-A, D H, M T, et.al. Dengue: la infección y la respuesta inmune. *ResearchGate*. 2009. p. 196–211. (https://www.researchgate.net/publication/200763420_Dengue_la_infeccion_y_la_respuesta_inmune).
52. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2006;143(2):345–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412060>
53. Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology* [Internet]. 1986;58(3):429–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3089915>

54. Bethell DB, Gamble J, Pham PL, Nguyen MD, Tran TH, Ha TH, et al. Noninvasive measurement of microvascular leakage in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2001;32(2):243–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170914>
55. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* [Internet]. 2000;74(17):7814–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933688>
56. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* [Internet]. 2002;87(1):42–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858187>
57. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* [Internet]. 2003;59:315–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696333>
58. Corrales-Aguilar E, Hun-Opfer L. Nuevas perspectivas sobre la patogénesis del dengue. *Acta Med Costarric*. 2012;54(2):75–85.
59. Narayan R, Raja S, Kumar S, Sambasivam M, Jagadeesan R, Arunagiri K, et al. A novel indirect ELISA for diagnosis of dengue fever. *Indian J Med Res* [Internet]. 2016;144(1):128–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27834337>
60. Sa-Ngasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakij S, Pattanakul K, et al. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2005/12/22. 2006;134(4):820–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371180>
61. Wilder-Smith A, Byass P. The elusive global burden of dengue. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016/02/10. 2016;16(6):629–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26874620>
62. Estofolete CF, Terzian ACB, Colombo TE, de Freitas Guimarães G, Ferraz HC, da Silva RA, et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. *J Infect Public Heal* [Internet]. 2018/10/06. 2019;12(2):178–81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30301701>
63. Mercado-Reyes M, Acosta-Reyes J, Navarro-Lechuga E, Corchuelo S, Rico A, Parra E, et al. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2019;147:e77. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30869010>
64. Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ, Uribe-García AM, González-Arismendy E, Castellanos JE, Calvo EP, et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2016/08/03. 2016;51:135–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497951>
65. (WHO) World health organization. Dengue and severe dengue. 2019. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>).

66. Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica*. 1986;6:3–4.
67. 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;
68. Rosen L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *South African Med J*. 1986;
69. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999;
70. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970;
71. Guzmán MG, Kourí G, Morier L, Soler M, Fernández A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ*. 1984;
72. Anto S, Sebodo T, Sutaryo, Suminta, Ismangoen. Nutritional status of Dengue haemorrhagic fever in children. *Paediatr Indones*. 1983;
73. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* [Internet]. 2000;181(1):2–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608744>
74. Dewi BE, Takasaki T, Tajima S, Sudiro TM, Larasati RP, Corwin AL, et al. Genotypic and phenotypic characteristics of DENV-3 isolated from patients with different disease severities in Indonesia. *Dengue Bull*. 2009;
75. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, De Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003;
76. Mota J, Rico-Hesse R. Humanized Mice Show Clinical Signs of Dengue Fever according to Infecting Virus Genotype. *J Virol*. 2009;
77. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology* [Internet]. 2010;7:226. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836894>
78. Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology* [Internet]. 2012;9:64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405440>
79. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Tenorio A, Rey GJ, Domingo C, Gallego-Gomez JC. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virology* [Internet]. 2008;5:101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18764951>
80. Salud IN de. Manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud pública . Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2011.
81. Nguyen THT, Clapham HE, Phung KL, Nguyen TK, Dinh TT, Nguyen THQ, et al.

Methods to discriminate primary from secondary dengue during acute symptomatic infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018/08/07. 2018;18(1):375. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30086716>

82. Saroch A, Arya V, Sinha N, Taneja RS, Sahai P, Mahajan RK. Clinical and laboratory factors associated with mortality in dengue. *Trop Doct* [Internet]. 2017/01/01. 2017;47(2):141–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424034>
83. Rojas EM, Herrera VM, Miranda MC, Rojas DP, Gomez AM, Pallares C, et al. Clinical indicators of fatal dengue in two endemic areas of Colombia: A hospital-based case-control study. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;
84. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016/08/30. 2016;63(12):1584–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578819>
85. Marchette NJ, Halstead SB, O'Rourke T, Scott RM, Bancroft WH, Vanopruks V. Effect of immune status on dengue 2 virus replication in cultured leukocytes from infants and children. *Infect Immun*. 1979;
86. Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: A retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;