



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y BIOMEDICINA

**“ESTUDIO DE CASOS DE DENGUE EN EL CENTRO DE CHIAPAS: PARTICIPACIÓN DE LA
RESPUESTA DE ANTICUERPOS Y LA VIREMIA EN LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE OMAR POZO AGUILAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

COTUTOR DE TESIS: DR. ARMANDO ULLOA GARCÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CELSO RAMOS GARCÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno POZO AGUILAR JORGE OMAR con número de cuenta 509013855 con la tesis titulada: "Estudio de casos de dengue en el Centro de Chiapas: Participación de la respuesta de anticuerpos y la viremia en la severidad de la enfermedad", realizada bajo la dirección de la DRA. BLANCA HAYDÉ RUÍZ ORDAZ:

Presidente:	DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal:	DR. CUAUHEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
Secretario:	DR. CELSO RAMOS GARCÍA
Suplente:	DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Suplente	DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 8 de enero de 2015.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Quiero agradecer al **Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por brindarme la oportunidad de formarme como Doctor en Ciencias en un Posgrado de excelencia académica.

Agradezco al **CONACYT y a la UNAM** por los apoyos recibidos, especialmente por la beca CONACYT, y el apoyo al Proyecto de Investigación PAPIIT/DGAPA-UNAM.

No puedo dejar de agradecer al **Instituto de Investigaciones Biomédicas** por haberme albergado en sus instalaciones como a un hijo de su hermano, el Posgrado en Ciencias Biológicas.

A la Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz

Por la confianza que me brindó al aceptar ser mi tutora para lograr mi formación integral como científico. Por el excelente entrenamiento en su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, por brindarme su apoyo en el campo académico, administrativo, profesional y personal. Por su disponibilidad permanente para discutir los datos. Por siempre tener respuesta a mis dudas, por enseñarme que siempre hay que tener un plan A y un plan B. Muchas gracias.

Al Dr. Armando Ulloa García

Por el apoyo brindado para mi ingreso al Programa de Posgrado y durante mi formación como científico. Por su valiosa asesoría, observaciones y sugerencias para el enriquecimiento del proyecto. Por su amplia experiencia que se refleja en mi trabajo. Muchas Gracias.

Al Dr. Celso Ramos García

Por el apoyo brindado durante mi formación como científico. Por su valiosa asesoría, observaciones y sugerencias para el enriquecimiento del proyecto, así como por la minuciosa revisión de mi tesis. Por su amplia experiencia que se refleja en mi trabajo. Muchas Gracias.

Agradecimientos

A la Dra. Verónica Monroy Martínez

Por su disponibilidad y apoyo en el laboratorio, especialmente con las técnicas de cultivo celular, del virus del dengue, en la extracción de ARN, por la asesoría en el desarrollo de los protocolos de RT-PCR tanto de tiempo real como de punto final. Por su apoyo decidido a pesar de sus múltiples tareas. Por sus valiosos consejos para solucionar los problemas cuando los ensayos no funcionaban.

A la Q.B.P. Jacqueline Barrios Palacios

Por su valioso apoyo en la extracción de ARN viral. Realmente me ayudaste cuando me agobiaban las tareas.

A mis compañeras y amigas de laboratorio:

Adriana, Gaby, Janet, Jacqueline, Sandra y Elizabeth. Por su valioso apoyo justo cuando lo necesité. Por sus observaciones, sugerencias, discusiones tanto en el laboratorio como en el seminario. Con quienes nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, por compartir los buenos y malos momentos. Unos se van, otros se quedan, pero siempre habrá un equipo.

Al Instituto de Salud

Por las facilidades brindadas para mi formación y el desarrollo de este proyecto en Chiapas.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Por las facilidades brindadas para mi formación académica.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública

Especialmente al Departamento de Serología, por las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Moisés Enríquez Gallegos (†), Dr. Jesús Elías Moreno, Dra. Blanca Sotelo, Dr. Rubén Zuarth, Dr. Juan Braulio Zenteno, Dr. Javier Maldonado, Dr. William Vázquez, Q.F.B. Joel

Iván Morales Domínguez por su disponibilidad y las facilidades brindadas para el reclutamiento de los sujetos de estudio. Al Q. Alejandro Sánchez por su apoyo incondicional.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo, a quienes no recordé al momento de estar escribiendo porque mi disco duro está muy duro y mi cabeza necesita un reinicio.

Dedicatorias

A Rocío por tu apoyo, comprensión, paciencia y sacrificio durante todos estos años, especialmente durante el desarrollo de mis estudios. Por estar siempre conmigo (aun en la distancia) compartiendo los buenos y los malos momentos. Por cuidar de las hijas durante mi estancia en México (eso sí que es difícil).

A mis hijas Stepahanía, Brenda, Carolina y Mariana, para que sigan mi ejemplo sin escuchar el canto de las sirenas. Si las cosas que valen la pena fueran fáciles, cualquiera las haría. Por la paciencia que tuvieron esperando mi regreso. Todo lo que hago lo hago por ustedes. Las quiero mucho.

A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me han demostrado a lo largo de mi vida. Por estar siempre pendientes de mí y de mi familia. Por sus consejos, sus valores, por el ánimo que siempre me inyectaron. Bertha, poderoso motor de superación para el alcance de nuestras metas. Fidel, ejemplo de responsabilidad y deseos de superación. Gracias por pensar en mi futuro y por quererme mucho.

A mis hermanos Fidel y Sofía por ser un ejemplo de superación. Por el apoyo que siempre me han brindado.

A la familia Jiménez Aguilar, especialmente a Jesús y Brenda, por continuar la tradición de hospitalidad de mis tíos Chucho y Shyra albergando a los sobrinos durante su estancia en México. Su apoyo ha sido fundamental para que yo terminara mis estudios.

Reflexiones y pensamientos

¿De qué estás hecho?

¿Quién evolucionó?

Algunos hombres nacen grandes. Otros tienen un impulso de grandes. Aprovecha tu impulso.

“Haz lo necesario para alcanzar tu más ardiente deseo y acabarás lográndolo”. L. van Beethoven.

Hacer que las cosas sucedan. Con ellos, sin ellos o a pesar de ellos.

Estar preparado es importante, saber esperar es más importante y aprovechar el momento oportuno es la clave del éxito.

“Hay un precio por elegir: El precio de tu transformación o el precio del arrepentimiento.

Pagar el precio de la transformación es tomar una decisión tan firme que transforma tu vida.

Es tener una alta convicción de que uno irá hasta las últimas consecuencias por la realización de sus metas. Es ser persistente, insistente, obstinado, cabeza dura, como decidas llamarlo”.

Martha Rey.

La determinación es un valor adquirido que te lleva a convertir tus sueños en realidad.

“Ya conocemos 1000 cosas que no sirven; nos hallamos, por tanto, más cerca de encontrar la que sirve”. T. A. Edison.

“El genio es 1% inspiración y 99% transpiración”. T. A. Edison.

“Imagination is more important than knowledge”. Albert Einstein.

“Da tu primer paso con fe, aunque no veas el final de la escalera, sólo da tu primer paso con fe”. Martin Luther King.

Nada es casualidad, todo es causalidad.

Deja huella en todo lo que hagas.

El mundo es pequeño y el tiempo corto.

"Aquí estoy concluyendo una nueva etapa, no hay edad para estudiar". Concepción Torres Villarreal, quien obtuvo su doctorado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Autónoma de México, a los 88 años. “Pero siempre es mejor hacerlo inmediatamente después de la licenciatura”. Jorge Pozo, 42 años.

El hombre se determina a sí mismo. Depende de sus decisiones, no de las condiciones.

“Es imposible para cualquiera comenzar a aprender lo que cree que ya sabe”. Epícteto.

Dos tipos de fanatismo han obstaculizado el avance de la Ciencia: El fanatismo de la fe y el fanatismo del excepticismo.

Índice	página
1. Introducción	1
1.1 El dengue	1
1.2 El virus del dengue	3
1.2.1 Estructura del virus del dengue	4
1.3 El vector	5
1.4 Transmisión del virus del dengue	6
1.5 Ciclo replicativo del virus del dengue	7
1.6 Características clínicas de la enfermedad y clasificación	9
1.7 Diagnóstico del dengue	13
1.8 El hospedero	17
1.8.1 Patogénesis	18
1.8.1.1 DG y amplificación dependiente de anticuerpos (ADA)	18
1.8.1.2 DG en primoinfección	19
1.8.1.3 Papel de los factores virales en la patogénesis del dengue	20
2. Antecedentes	23
3. Planteamiento del problema	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivo general	25
5.1 Objetivos específicos	25
6. Estrategias y métodos	26
6.1 Estudio epidemiológico	26
6.2 Determinación de la respuesta (primaria o secundaria) de anticuerpos mediante ensayo de avidez de IgG	29
6.3 Extracción de RNA viral	31
6.4 Tipificación del virus dengue (Método de Lanciotti)	31
6.5 Determinación de la carga viral mediante PCR en tiempo real	33
6.6 Análisis estadístico de los datos	34
7. Resultados	37
7.1 Caracterización epidemiológica de la población estudiada	37
7.1.1 Características clínicas	39
7.1.2 Condiciones coexistentes como factores de riesgo para presentar DG	44

7.2 Evaluación de la sensibilidad de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009 para la identificación de DG	45
7.3 Extracción de ARN viral y tipificación del virus infectante mediante RT-PCR de punto final	48
7.4 Determinación de la respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria) mediante avidéz de anticuerpos IgG por ELISA	49
7.5 Cuantificación de carga viral mediante RT-PCR en tiempo real	49
8. Discusión	56
9. Conclusiones	68
10. Referencias Bibliográficas	69

Lista de figuras	página
Fig. 1. Distribución mundial del mosquito <i>Ae. aegypti</i> , principal vector del virus del dengue	1
Fig. 2. Poliproteína del DENV	4
Fig. 3. Esquema de una partícula viral	5
Fig. 4. Ciclo replicativo del DENV	9
Fig. 5. Clasificación de caso de dengue de acuerdo con la Guía de la OMS publicada en 1997	10
Fig. 6. Clasificación de caso de dengue de acuerdo con la Guía de la OMS publicada en 2009	13
Fig. 7. Valencia y avidéz de las interacciones antígeno-anticuerpo	17
Fig. 8. Región de estudio	27
Fig. 9. Análisis de correspondencia entre las manifestaciones clínicas y la severidad de la enfermedad	41
Fig. 10. Distribución de los casos de dengue de acuerdo con la severidad de la enfermedad y el recuento plaquetario.	42
Fig. 11. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del nadir plaquetario.	44
Fig. 12. Desempeño de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009 para la detección de DG	46
Fig. 13. Amplificación y curva estándar para la determinación de la carga viral	50
Fig. 14. Cinética de la carga viral de acuerdo con el día de inicio de síntomas	52
Fig. 15 Magnitud de la viremia por día de inicio de síntomas	54
Fig. 16 Persistencia de la carga viral durante la defervescencia	55

Lista de tablas	página
Tabla 1. Valor de corte del índice de avidéz de Ac's IgG	31
Tabla 2. Posición de la 3'RNT en los serotipos del DENV	33
Tabla 3. Distribución de la población de estudio por grupo de edad	38
Tabla 4. Distribución de los casos por género	39
Tabla 5. Comparación de la clasificación de 1997 versus el nivel de intervención clínica.	47
Tabla 6. Comparación de la clasificación de 2009 versus el nivel de intervención clínica.	47
Tabla 7. La respuesta de anticuerpos en una infección por DENV-2 y gravedad de la enfermedad	49
Tabla 8. Distribución de la carga viral en los pacientes con Dengue Grave y Dengue con o sin signos de alarma.	51

Lista de abreviaturas

DENV	Virus dengue
OMS	Organización Mundial de la Salud
FD	Fiebre por dengue
DG	Dengue Grave
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
DGE	Dirección General de Epidemiología
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
RNT	Región no traducible
NS	Proteína no estructural
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IgG	Inmunoglobulina tipo G
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
SCHD	Síndrome de choque por dengue
D-SA	Dengue sin signos de alarma
D+SA	Dengue con signos de alarma
OR	Razón de momios (probabilidades)
OPS	Organización Panamericana de la Salud
FI	Fiebre indiferenciada
HAI	Prueba de inhibición de la hemaglutinación
EIA	Ensayo inmunoenzimático
K_d	Constante de disociación
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ADA	Amplificación dependiente de anticuerpos
FcγR	Receptor de la fracción cristalizante de inmunoglobulinas tipo G
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCCh	Depresión Central de Chiapas
GECH	Gobierno del Estado de Chiapas
TMB	Tetrametilbencidina
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
DO	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato de sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
cDNA	DNA complementario
S	Sensibilidad
E	Especificidad
COR	Curva de características operador del receptor
AC	Análisis de correspondencia
DIS	Día de inicio de la enfermedad
qRT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real)
CBR	Razón costo/beneficio

Resumen

El dengue es la principal arbovirosis a nivel mundial. Los pacientes con dengue muestran un amplio espectro de manifestaciones clínicas. La patogénesis de la enfermedad no está bien comprendida. La participación de la viremia en la severidad de la enfermedad podría ser muy importante. Asimismo, debido a la controversia que existe en la aplicación de las clasificaciones para caso de dengue de la OMS de 1997 y de 2009, es necesario evaluar el desempeño de ambas para la identificación de casos graves de dengue.

Para estudiar el papel de la viremia en la severidad de la enfermedad se estudiaron casos de dengue confirmados serológicamente mediante pruebas de antígeno NS1, anticuerpos IgM e IgG. Se categorizaron los casos de acuerdo a las clasificaciones de la OMS de 1997 y de 2009. Se comparó el desempeño de ambas clasificaciones para la identificación de casos severos de la enfermedad. La tipificación del aislado infectante se realizó mediante RT-PCR de punto final y los niveles de carga viral se evaluaron por RT-PCR en tiempo real. Para determinar la respuesta de anticuerpos como primaria o secundaria se realizaron pruebas de avididad de anticuerpos IgG mediante ELISA.

De 489 pacientes con dengue confirmados por laboratorio, 206 (42.1%) se clasificaron como fiebre por dengue (FD), 266 (54.4%) como fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y 17 (3.5%) como síndrome de choque por dengue (SCHD), de acuerdo con los criterios de la clasificación de 1997. De estos, 380 (77.7%) pacientes fueron reclasificados como dengue no grave; los cuales incluyeron 177 (36.2%) como dengue sin signos de alarma (D-SA); 213 (43.6%) como dengue con signos de alarma (D+SA) y 99 (20.2 %) pacientes fueron clasificados como dengue grave (DG). DENV-2 fue el serotipo infectante prevalente (99%), mientras que DENV-1 produjo los casos restantes. Se asoció la respuesta secundaria de anticuerpos con el DG (OR = 9.5, P = 0.0001). Los niveles iniciales de viremia fueron más altos en los pacientes con DG que en los pacientes con D±SA. A partir del día 5 de la enfermedad, los niveles de viremia permanecieron elevados en DG mientras que en D±SA disminuyeron significativamente. El embarazo es un factor de riesgo para DG en las mujeres (P = 0.0155, IC95% = 1.3-14, prueba exacta de Fisher). El riesgo para desarrollar DG fue similar tanto en diabéticos como en no diabéticos (P = 0.6845).

Se enfatiza la importancia de la viremia y la respuesta de anticuerpos en la severidad de la enfermedad. Se demostró que la clasificación de la OMS de 2009 muestra una mayor sensibilidad para detectar casos graves de dengue y una mejor razón costo-beneficio que la clasificación de 1997. Finalmente, para clasificar los casos de Dengue, se sugiere la aplicación de la clasificación de 2009, mientras se desarrollan estudios para mejorar la clasificación.

Abstract

Background

Dengue is the major arboviral disease in the world which affects 50-100 million people annually in tropical and subtropical countries. Dengue patients show a broad clinical spectrum, due mainly to interaction between virus and host factors.

Methods and Findings

Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR, and serology were used to confirm dengue infection, and to determine serotype and RNA viral concentration in serum samples, and to determine antibody response as primary or secondary in children and adult patients from Chiapas, Mexico. The traditional and revised WHO dengue case classifications were compared. Out of 489 patients with laboratory-confirmed dengue 206 (42.1%) were classified as Dengue Fever (DF), 266 (54.4%) as Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and 17 (3.5%) as Dengue Shock Syndrome (DSS) according to the traditional classification. 380 (77.7%) patients were reclassified as non severe dengue; which comprised 177 (36.2%) patients as dengue without warning signs (D-WS); 213 (43.6%) as dengue with warning signs (D+WS). 99 (20.2%) patients were classified as severe dengue (SD). Dengue Virus serotype 2 (DENV-2) was the commonest infecting serotype (99%) whereas DENV-1 was detected in 1%. Secondary response was associated with SD (OR=9.5, P=0.0001). Early viremia levels were higher in SD patients than D±WS. From day 5 of illness, viremia levels remains high in SD while in D±WS decreases significantly (P<0.0001). Pregnant women were more likely to suffer SD than women without this coexisting condition (P=0.0155, 95%, CI=1.3-14, Fisher's exact test). The risk for developing SD was similar between diabetic and non diabetic patients (P=0.6845).

Conclusions

The revised classification appears to have higher sensitivity to detect SD. In the context of a DENV-2 infection, SD cases could result from the combined effects of viremia and secondary infection. Pregnant women should be more strictly monitored because their higher risk for

developing SD. This could be useful for early clinical diagnosis and opportune treatment of severe dengue.

1. INTRODUCCION

1.1 El Dengue

El dengue es una enfermedad viral aguda y sistémica ocasionada por cualquiera de los 4 serotipos del virus dengue (DENV-1, 2, 3 y 4) el cual es transmitido al humano por la hembra de mosquitos pertenecientes al género *Aedes* (*Ae aegypti*, *Ae albopictus*). El dengue es la enfermedad viral transmitida por vector más importante a nivel mundial, constituyendo un problema importante de salud pública que crece rápidamente (Guzmán *et al.*, 2006). De acuerdo a la OMS anualmente se presentan entre 50-100 millones de casos de Fiebre por dengue (FD), de los cuales aproximadamente 500,000 pueden presentar las formas graves de la enfermedad (WHO, Factsheet No. 117), con una letalidad del 2.5%. Sin embargo, en ausencia de un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno, la letalidad puede ser superior al 20% (WHO, Factsheet No. 117). En la actualidad no existe fármaco antiviral ni está disponible ninguna vacuna autorizada para el dengue (Nguyen *et al.*, 2013). Actualmente, la enfermedad es endémica en más de 100 países de regiones tropicales y subtropicales y más de tres mil millones de personas habitan en estas zonas endémicas, por lo que se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad (Fig. 1) (WHO, Factsheet No. 117).

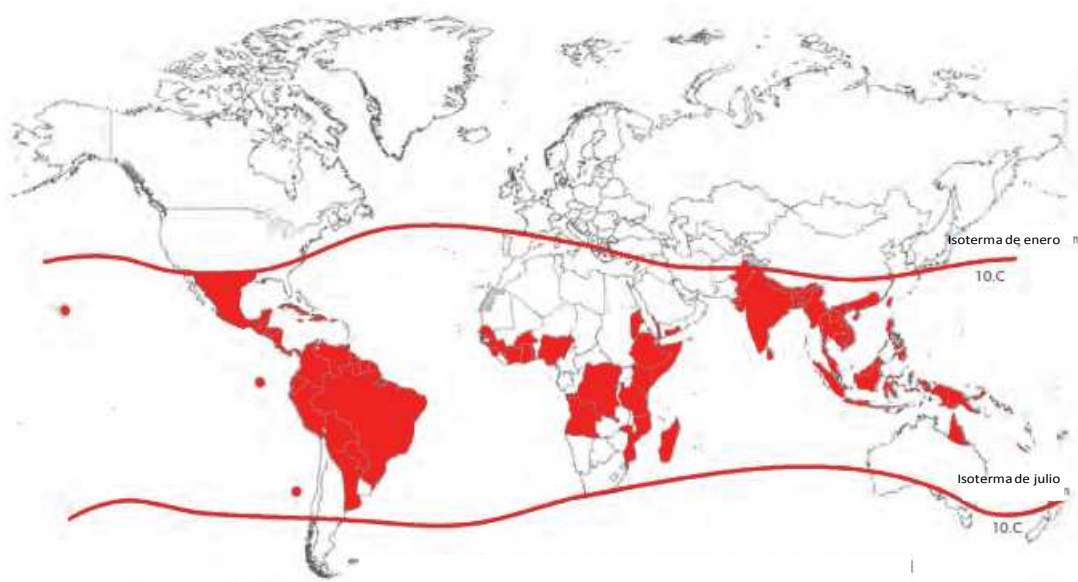


Fig. 1. Distribución mundial del mosquito *Ae. aegypti*, principal vector del virus del dengue. Las líneas rojas corresponden a las isotermas de Enero y Julio, las cuales indican el límite geográfico potencial en los hemisferios norte y sur para la supervivencia del mosquito. Adaptado del Mapa de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009).

La expansión del dengue se asocia con la combinación de diferentes factores, entre otros: urbanización creciente, crecimiento de la población mundial, incremento en los viajes internacionales, migración de poblaciones, control vectorial poco efectivo (Gubler, 2004). Actualmente, se ha considerado que el cambio climático puede ser un factor importante que contribuya a la mayor dispersión del vector y la enfermedad (Hsieh y Chen, 2009).

Por otro lado, mediante estudios de cohorte llevados a cabo en América y Asia se ha observado que la incidencia de la enfermedad en estos continentes, puede variar entre 5 y 29%, con una incidencia de dengue asintomático de 3.4-28%, una incidencia de dengue sintomático de 0.1 a 1.8% y una incidencia de DG de 0.02 a 0.6% (todas las proporciones se calculan en relación a la población estudiada) (Sangkawibha *et al.*, 1984; Burke *et al.*, 1988; Thein *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 1999; Endy *et al.*, 2002a; Endy *et al.*, 2002b; Porter *et al.*, 2005; Balmaseda *et al.*, 2006).

En la República Mexicana, en 2009 se reportaron 41, 972 casos de fiebre por dengue (FD) y 10, 562 casos de fiebre hemorrágica por dengue (FHD), los cuales representan un incremento de 7 veces con respecto a los reportados en 2004 (DGE, 2009; DGE, 2004). En el caso del estado de Chiapas, se conoce que existen condiciones epidemiológicas propicias para que se presente una transmisión elevada del dengue (población primo-infectada, alta densidad del vector, más de un serotipo viral circulando en los brotes, entre otras). Actualmente es uno de los estados con mayor endemicidad en la República Mexicana. Por ejemplo, en 2009 se reportaron 2, 425 casos de FD y 1, 191 casos de FHD, que en referencia a los casos presentes en 2004, representa un incremento de 6 veces (DGE, 2009; DGE, 2004). En la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, hasta el año de 2005 se ha reportado una transmisión continua con una proporción 1:1 de casos de FD y FHD. Sin embargo, se desconocen los factores de riesgo (individuales, del virus y/o epidemiológicos) que puedan estar participando en el incremento de los casos graves del dengue en Chiapas.

1.2 El Virus Dengue.

El DENV al ser transmitido por artrópodos, está clasificado dentro de los Arbovirus (*arthropod-borne virus*), los cuales taxonómicamente se agrupan en 5 familias (Hanley, Weaver, 2008). El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* género *Flavivirus*, al cual pertenecen aproximadamente 70 miembros; de éstos, aproximadamente la mitad son patógenos para el hombre como el virus de la Fiebre Amarilla, el Virus del Oeste del Nilo, el virus de la Encefalitis Japonesa, entre otros (Gubler, 2001).

Los *Flavivirus* tienen características estructurales relacionadas, presentan una cadena sencilla de RNA de alrededor de 11 kilobases de polaridad positiva (es decir funciona como mRNA), que presenta en sus extremos dos regiones no traducibles (RNT 3' y 5') y codifica para una poliproteína que es procesada co y pos-traduccionalmente tanto por proteasas virales como del huésped, para producir tres proteínas estructurales: la proteína C, que compone la cápside, la cual rodea y protege al ácido nucleico; la proteína M, que forma la membrana viral, y la proteína de envoltura o E; y siete proteínas no estructurales (NS), dentro de las cuales se encuentran las enzimas necesarias para la replicación viral (Fig. 2) (Gubler, 2001).

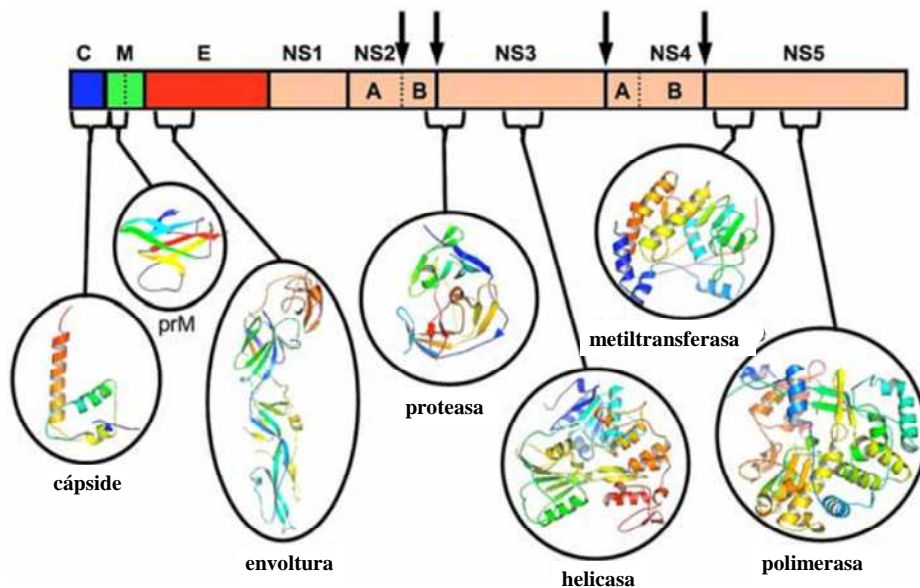


Fig. 2. La figura muestra los elementos estructurales de la poliproteína del DENV. Las flechas verticales indican los principales sitios de corte que son reconocidos por la proteasa NS2B-NS3 del virus dengue (Tomlinson *et al.*, 2009).

1.2.1 Estructura del Virus del Dengue

El virus del dengue es esférico y mide aproximadamente 50-60 nanómetros de diámetro. Presenta una envoltura glicoproteica externa y una bicapa lipídica interna derivada del hospedero. La envoltura del DENV presenta 180 copias de la proteína de envoltura (E) y 180 copias de la proteína de membrana (prM/M) (Pereira and Kuhn, 2008). En la superficie de un virión maduro, la proteína E se encuentra en 90 homodímeros que forman una envoltura lisa. En un virión inmaduro, E y prM forman 90 heterodímeros que se extienden como 60 espículas triméricas en la superficie viral (Modis *et al.*, 2004). La proteína prM es el precursor de la proteína M. Esta proteína proporciona resistencia a los ambientes ácidos y protege a la proteína E de la fusión prematura durante el tránsito a través del ambiente ácido del complejo del Golgi. La escisión del péptido de la proteína prM genera la proteína M. La bicapa lipídica confina una nucleocápside isométrica de 30-35 nm de diámetro. La nucleocápside consiste en la proteína de la cápside (C) que envuelve al genoma de ácido

ribonucleico (ARN) (Fig. 3). El genoma del dengue es de aproximadamente 11000 bases de longitud.

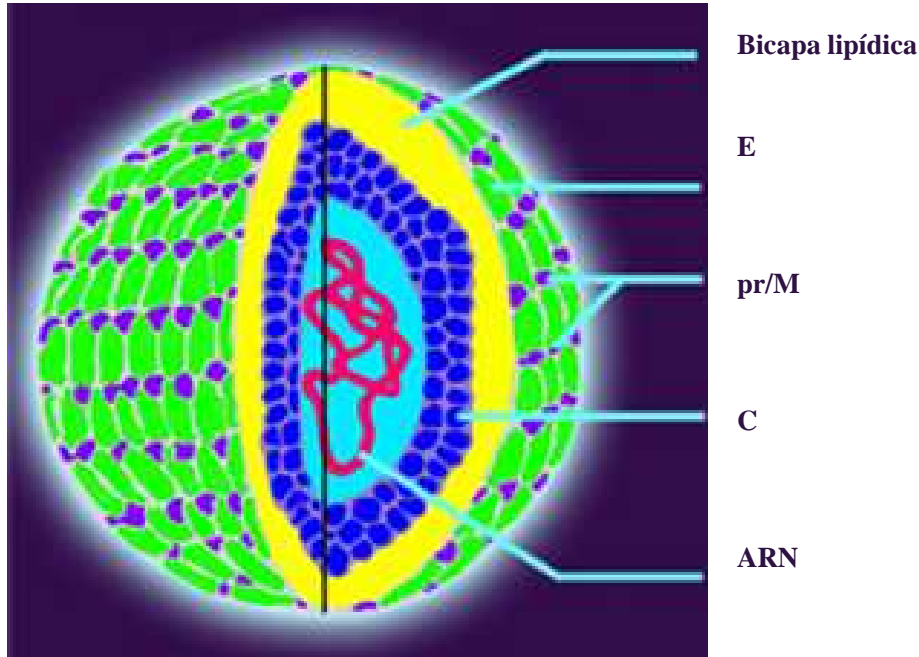


Fig. 3. Esquema de una partícula viral que muestra las proteínas estructurales que la conforman: la proteína C, que compone la cápside que rodea y protege al ácido nucleico; la M, que forma la membrana viral, y la E que conforma la envoltura. La proteína prM es el precursor de la proteína M. La proteína prM protege a la proteína E de la fusión prematura durante el tránsito a través del ambiente ácido del complejo de Golgi. La escisión del péptido pr de la proteína prM genera la proteína M. Adaptado de ILM, 2012.

1.3 El vector.

Los diferentes serotipos del DENV se transmiten al humano mediante la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, su principal vector. Este mosquito es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida alrededor del mundo, especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S (WHO, 2009). Estos límites geográficos corresponden aproximadamente a una isoterma invernal de 10°C. Debido a las bajas temperaturas, *Ae. aegypti* es relativamente poco común arriba de los 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Sin embargo, se ha reportado su presencia a 2400 msnm en Eritrea, África; a 2200 msnm en Colombia, a 2121

msnm en India (OPS, 1995) y a 1700 msnm en Taxco, Guerrero (Herrera-Basto *et al.*, 1992). La presencia de *Ae. aegypti* en estas altitudes representa la capacidad del mosquito para adaptarse a nuevos ambientes y el potencial para desarrollar brotes epidémicos en ciudades ubicadas en alturas similares. Los brotes de dengue también se han atribuido a *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y varias especies del complejo *Aedes scutellaris*. En décadas recientes, *Ae. albopictus* se ha propagado de Asia a África, América y Europa, con ayuda del comercio internacional de llantas usadas, en las cuales se depositan los huevecillos cuando contienen agua estancada de lluvia. La resistencia a la desecación, fenómeno conocido como diapausa, que poseen los huevos de *Ae. aegypti* facilita la supervivencia de la especie durante condiciones climáticas adversas como en ausencia de agua (Fernández-Salas, 1999). Para producir sus huevecillos la hembra debe alimentarse de sangre, la cual adquiere del humano, mientras que los machos se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a su alrededor (Fernández-Salas, 1999). Para la formación de los huevos, la hembra necesita diez aminoácidos esenciales: arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Estos aminoácidos son esenciales porque su omisión de la dieta de los mosquitos hembra, imposibilita la producción de huevos. Para depositar sus huevos la hembra grávida prefiere los recipientes oscuros o sombreados que contienen agua relativamente limpia, clara y transparente, en los cuales los huevos pueden eclosionar y pasar a la fase larvaria (Clements, 1992). La fase larvaria tiene lugar en recipientes de agua, que sirven de criaderos, generalmente en viviendas humanas o alrededor de ellas. Las larvas tienen 4 estadios o fases evolutivas inmaduras, conocidos como estadios I, II, III y IV. La larva de estadio IV se transforman en pupa, que tiene forma de coma; la cual está envuelta en un exoesqueleto de queratina impermeable del que posteriormente emerge el nuevo adulto o mosquito.

1.4 Transmisión del virus dengue.

Se han descrito 2 mecanismos de transmisión del DENV: La transmisión horizontal (humano-mosquito) y la transmisión vertical o transovárica (mosquito hembra-huevecillos). Por el mecanismo principal, el DENV circulante en la sangre de personas que portan el virus, es ingerido por la hembra del mosquito durante la alimentación. Entonces, el virus entra al lumen del intestino del mosquito y posteriormente se distribuye de manera

sistémica hasta alojarse en las glándulas salivales a lo largo de un periodo de 8-12 días (periodo extrínseco de replicación viral). Después del periodo extrínseco, el vector puede transmitir el virus al humano durante el resto de su vida mediante las alimentaciones siguientes. *Ae. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus porque es altamente antropofílico y frecuentemente pica varias veces antes de completar la ovogénesis. El DENV también puede transmitirse verticalmente mediante la transmisión transovárica, proceso por el cual el mosquito hembra transmite al DENV a su descendencia (Gubler, 2001). Varios estudios in vivo e in vitro han mostrado la ocurrencia de transmisión transovárica del DENV en el mosquito *Ae. aegypti*. Por ejemplo, se ha reportado la persistencia de DENV en generaciones sucesivas de mosquitos infectados transováricamente (Vinod *et al.*, 2002). Ensayos de laboratorio han demostrado que la progenie de los mosquitos infectados puede transmitir el virus horizontalmente cuando se les permite picar sobre alimentadores de membrana con solución salina fosfatada de albúmina bovina (Mourya *et al.*, 2001). Además se ha demostrado la transmisión transovárica de DENV en *Ae. aegypti* y *albopictus*, colectados en campo como larvas y que se mantuvieron en condiciones de insectario hasta convertirse en adultos. En los cuales posteriormente se demostró la presencia de DENV-2, 3 y 4 al ser analizados por RT-PCR (Günther *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que la transmisión transovárica puede ser un mecanismo para el mantenimiento del DENV en la naturaleza durante periodos interepidémicos, en ausencia de hospederos vertebrados infectados o bajo condiciones ambientales desfavorables (Vinod *et al.*, 2002, Martins *et al.*, 2012).

1.5 Ciclo Replicativo del Virus Dengue.

Una vez en el humano, el virus dengue se internaliza en células diana, mediante endocitosis mediada por receptores. Se ha reportado que la proteína E del DENV es la que reconoce dos tipos de receptores (Modis *et al.*, 2004) en la superficie celular hospedera: uno ubicuo de baja afinidad que captura al virus e incrementa la concentración viral local y otro de alta afinidad que favorece la internalización (Tomlinson *et al.*, 2009; Clyde *et al.*, 2006). Se conoce que la endocitosis del DENV en células permisivas está mediada por clatrina (EMC) (Suksanpaisan *et al.*, 2009). Posterior a la acidificación del endosoma, la proteína E presenta cambios conformacionales (se trimeriza) que favorecen la fusión de las

membranas viral y endosomal (Modis *et al.*, 2004). Posteriormente, se libera el genoma viral en el citoplasma. El genoma funciona como mensajero y es traducido en una poliproteína, la cual es procesada tanto por las proteasas virales como del hospedero para producir 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que se requieren tanto para la replicación viral como para el ensamblaje del virión. Paralelamente se sintetiza una cadena de ARN de sentido negativo, la cual sirve como templado para la producción de múltiples copias de ARN viral de sentido positivo. NS3 y NS5 son las enzimas involucradas en la replicación del DENV. El extremo amino-terminal de la proteína NS3 y su cofactor NS2B funcionan como proteasa. Asimismo, NS3 presenta un dominio de helicasa y actividad de ARN nucleósido trifosfatasa; NS5 tiene actividad de metiltransferasa y de ARN polimerasa (Clyde *et al.*, 2006). Rondas sucesivas de estos procesos, producen niveles elevados de proteínas y ARN viral, los cuales son ensamblados en la membrana del retículo endoplásmico (Fields *et al.*, 2001). Finalmente, las partículas virales recién ensambladas maduran en el complejo de Golgi para ser secretadas por exocitosis al medio extracelular (Fig. 4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

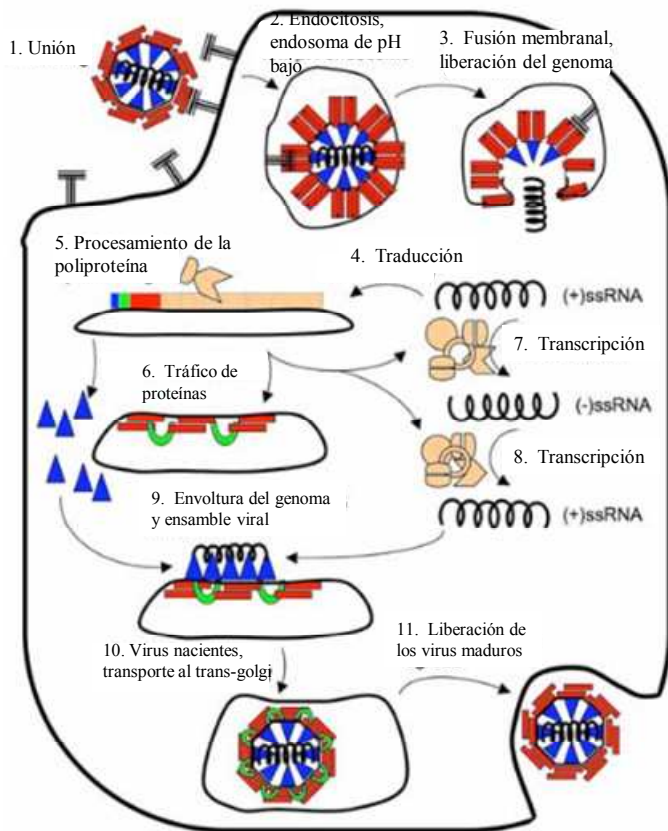


Fig. 4. Ciclo replicativo del DENV. 1. El virus se une e ingresa a la célula vía endocitosis mediada por clatrina (EMC). 2. La acidificación endosomal genera una trimerización irreversible de la proteína E, exponiendo el dominio de fusión. 3. Después de la fusión de membranas, el genoma se libera en el citoplasma (RNA de polaridad positiva) 4. Donde se traduce en una poliproteína que es 5. procesada co y postraduccionalmente en tres proteínas estructurales y siete no estructurales (NS). 6. Las proteínas se transportan al retículo endoplásmico. 7. Posterior a la traducción del genoma se sintetiza una cadena de ARN de sentido negativo, 8. la cual sirve como templado para la producción de múltiples copias de ARN viral de sentido positivo. 9. Sucesivas rondas de traducción producen altos niveles de proteínas y ARN virales, los cuales son ensamblados en la membrana del retículo endoplásmico (Fields, 2001). 10. Finalmente, las partículas virales recién ensambladas maduran en el complejo de Golgi, 11 para ser secretadas por exocitosis al medio extracelular. Adaptado de Tomlison *et al.*, 2009.

1.6 Características clínicas de la enfermedad y clasificación.

El dengue presenta un espectro clínico muy amplio que varía de manera impredecible desde una infección inaparente hasta letal. Históricamente, se consideró al dengue como una enfermedad debilitante pero no mortal. A finales de los 1960's, esta percepción cambió debido a la presencia de brotes de fiebre hemorrágica por dengue con una elevada letalidad

en niños de Asia Sudoriental (Nimmannitya *et al.*, 1969; Nimmannitya 1987; Cohen y Halstead, 1964). La información clínica surgida de estos brotes formó las bases para la clasificación clínica del dengue publicada en 1975 y actualizada por la OMS en 1997 (WHO, 1975; WHO, 1997). De acuerdo con la clasificación de 1997, las infecciones sintomáticas por DENV se agrupan en 3 categorías: Fiebre Indiferenciada (FI), Fiebre por Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD). A su vez, la FHD se sub-clasificó en 4 grados de severidad, de los cuales, los grados III y IV se definieron como Síndrome de Choque por Dengue (SCHD) (WHO, 1997). La FD se caracteriza por fiebre elevada con al menos dos de las siguientes manifestaciones clínicas: Dolor de cabeza, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, náuseas, vómito, exantema, manifestaciones hemorrágicas y leucopenia. Para la FHD se requiere de la presencia de 4 criterios clínicos: Fiebre, tendencia hemorrágica (hemorragia espontánea o prueba del torniquete positiva), trombocitopenia (conteo plaquetario $\leq 100,000$ células/ μ L) y extravasación plasmática evidenciada por ascitis, efusión pleural o hemoconcentración $\geq 20\%$ (Fig. 5).

Clasificación de la OMS (1975, 1997)		
Infección sintomática		
Fiebre indiferenciada	Fiebre por dengue	Fiebre hemorrágica por dengue
	Fiebre con 2 de los siguientes:	Se deben cumplir 4 criterios:
	Dolor de cabeza	Fiebre
	Artralgia	Manifestaciones hemorrágicas
	Dolor retroorbital	Trombocitopenia
	Exantema	Evidencia de extravasación plasmática
	Mialgia	
	Manifestaciones hemorrágicas	
	Leucopenia	
	Y serología	
	O asociación de casos en lugar y tiempo con otros casos confirmados	

Fig. 5. Clasificación de caso de dengue de acuerdo con la Guía de la OMS publicada en 1997. El dengue se clasifica como (1) Fiebre indiferenciada, (2) Fiebre por Dengue (FD) y (3) Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD). Para definir un caso como FHD se requiere cumplir los 4

criterios: (1) Fiebre, (2) manifestaciones hemorrágicas, (3) trombocitopenia (recuento plaquetario $\leq 100,000$ células/ μL) y (4) evidencia de extravasación plasmática. Adaptado de Srikiatkachorn, 2011.

Sin embargo, debido a las modificaciones en la epidemiología del dengue en diferentes regiones geográficas (presentación en otras regiones geográficas y diferentes grupos étnicos), se ha dificultado el uso correcto y la aplicación de la clasificación de la OMS de 1997, la cual está basada en casos pediátricos de Asia Sudoriental. Los problemas en el uso de esta clasificación se han reportado por diferentes grupos (Guha-Sapir and Schimmer, 2005; Deen *et al.*, 2006; Rigau-Perez, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Los problemas para aplicar los criterios de clasificación de FHD aunado al incremento en los casos de dengue clínicamente severos que no siempre cumplían los estrictos criterios de la OMS (por ejemplo: falla hepática, encefalopatía), condujeron a la revisión de esta clasificación. Para su evaluación, el Programa para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (WHO/TDR) desarrolló un estudio clínico prospectivo multicéntrico en diferentes grupos étnicos, en diferentes regiones endémicas para dengue, con el objetivo de desarrollar una clasificación basada en evidencia. Los hallazgos de éste estudio confirmaron que utilizando un conjunto de parámetros clínicos y de laboratorio, es posible observar una clara diferencia entre el Dengue Grave (DG) y el Dengue (Alexander *et al.*, 2011). El grupo de pacientes con dengue no grave se dividió en dos subgrupos de acuerdo a los signos y síntomas presentados: Dengue sin signos de alarma (D-SA) y Pacientes de Dengue con signos de alarma (D+SA). Cabe señalar que los pacientes sin signos de alarma pueden desarrollar dengue grave. Esta clasificación fue incorporada a las Guías de la OMS en 2009 (Alexander *et al.*, 2011).

Los principales signos y síntomas de los pacientes con dengue son fiebre alta de inicio súbito, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retro-ocular y exantema. Pueden aparecer manifestaciones hemorrágicas leves como petequias, epistaxis y gingivorragia (WHO, 2009). El curso de la enfermedad muestra 3 etapas: Febril (aguda), crítica y de convalecencia. Durante la fase febril es difícil diferenciar el DG del dengue. Sin embargo, durante la etapa crítica, la cual coincide aproximadamente con la defervescencia, cuando la temperatura baja a $37.5-38^{\circ}\text{C}$ o menos y permanece bajo este nivel, puede incrementarse la

permeabilidad vascular, lo cual genera hemoconcentración. Una leucopenia progresiva, seguida por un rápido descenso en plaquetas precede a la extravasación plasmática. Mientras la mayoría de los individuos sintomáticos se recuperan después de un curso clínico no severo autolimitante, una pequeña proporción progresa a la enfermedad severa principalmente caracterizada por extravasación plasmática con o sin hemorragia. Cuando se pierde un volumen crítico de plasma por extravasación puede ocurrir choque que se define por una diferencia entre la tensión sistólica y diastólica ≤ 20 mmHg. Los pacientes que mejoran después de la defervescencia, se clasifican dentro del dengue. Algunos pacientes pueden evolucionar a la fase crítica antes de la defervescencia. Otros pueden manifestar signos de alarma (Dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de fluido, hemorragia en mucosas, letargia o inquietud, hepatomegalia, incremento del hematocrito concurrente con rápido decremento de trombocitemia). El DG se define por uno o más de los siguientes signos: 1) extravasación plasmática que puede conducir a choque o a acumulación de fluidos, con o sin dificultad respiratoria; 2) hemorragia severa, 3) daño severo de órganos (falla hepática, encefalopatía, falla renal, cardiomiopatía) (Fig. 6).

Sin embargo, actualmente tanto la clasificación de 1997 como la clasificación de 2009 se utilizan ampliamente de manera indistinta (WHO, 2009; Barniol *et al.*, 2011; Narváez *et al.*, 2011) porque existe cierta resistencia a usar la clasificación revisada. En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector aun funciona de acuerdo con los criterios de la clasificación de 1997. En México no existen estudios que muestren la eficacia de ambas clasificaciones para la detección de los casos severos del dengue, estudios que serían necesarios para obtener evidencias que orienten a los servicios de salud en la toma de decisiones efectivas.



Fig. 6. Clasificación de caso de dengue de acuerdo con la Guía de la OMS publicada en 2009. El dengue se clasifica como Dengue con o sin Signos de Alarma (D±SA) y Dengue Grave (DG). El diagnóstico de dengue requiere de la presencia de fiebre y al menos 2 manifestaciones clínicas o signos de alarma. El DG se define como dengue con una o más de de las siguientes características: (1) Extravasación plasmática grave que conduce a choque o dificultad respiratoria, (2) hemorragia severa o (3) compromiso grave de cualquier órgano. Adaptado de las Guías de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009).

1.7 Diagnóstico del dengue

Para diagnosticar el dengue pueden emplearse dos tipos de métodos: La detección directa del DENV o la detección indirecta de los anticuerpos anti-DENV. El aislamiento del virus en cultivo celular o en cerebro de ratón lactante continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico del dengue. Sin embargo, debido a que la obtención de resultados puede tardar más de una semana, existe la necesidad de aplicar métodos más sensibles y rápidos para la detección viral temprana (Gurukumar *et al.*, 2009). Para detectar ARN del DENV en el suero de pacientes se han usado varios métodos de PCR en punto final (Lanciotti *et al.*,

1992; Harris *et al.*, 1998). Además, recientemente se han usado métodos basados en PCR en tiempo real (Lai *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2005). El PCR en tiempo real tiene varias ventajas sobre el PCR de punto final: mayor sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y riesgo reducido de contaminación, además de que permite cuantificar la carga viral, la reacción se puede observar mientras la amplificación progresa, haciéndola una herramienta útil para evaluar el posible papel de la viremia en la patogénesis del dengue (Gurukumar *et al.*, 2009). En contraste, el producto de PCR de punto final se detecta hasta que la amplificación ha terminado y el amplicón se visualiza en un gel de agarosa.

La identificación del serotipo viral es importante porque constituye uno de los factores de riesgo virales que pueden determinar la severidad del dengue. Por ejemplo, los serotipos 2 y 3 se han asociado con el síndrome de choque por dengue con mayor frecuencia que los tipos 1 y 4 en el Sudeste Asiático (Rosen, 1986). Aunque el serotipo infectante se pueda evaluar mediante el incremento de anticuerpos específicos para un serotipo en particular, en la práctica, la determinación específica es difícil, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos contra los Flavivirus. El requerimiento de muestras séricas pareadas causa un retraso en el diagnóstico y los resultados frecuentemente son imprecisos. El aislamiento viral puede tardar de días a semanas y no siempre es exitoso, debido a las pequeñas cantidades de virus viable en el inóculo o a la inapropiada manipulación de las muestras. Para mejorar la detección y tipificación de los dengue virus, Lanciotti y colaboradores establecieron un método rápido, sensible y específico que fuera clínica y epidemiológicamente útil mediante la amplificación inicial de secuencias conservadas del genoma viral de los diferentes serotipos y una posterior amplificación de secuencias genómicas específicas para cada serotipo (1992).

Por otro lado, el tipo de respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria) es importante porque constituye un factor de riesgo para que se produzca la forma grave de la enfermedad. La discriminación entre infección primaria y secundaria, se puede realizar mediante el análisis de muestras pareadas, pero no siempre se pueden obtener. Para este propósito, tradicionalmente se ha usado la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Sin embargo, en ausencia de un cambio en títulos de anticuerpos o en el caso de

muestras únicas, la prueba no puede interpretarse (WHO, 1997). También se ha propuesto la evaluación de la razón IgM/IgG mediante ELISA (Innis *et al.*, 1989), la cual permite un diagnóstico diferencial rápido. Sin embargo, esta prueba presenta el inconveniente de que la persistencia de IgM por más de 8 meses después de la infección puede resultar en errores de interpretación (Matheus *et al.*, 2005).

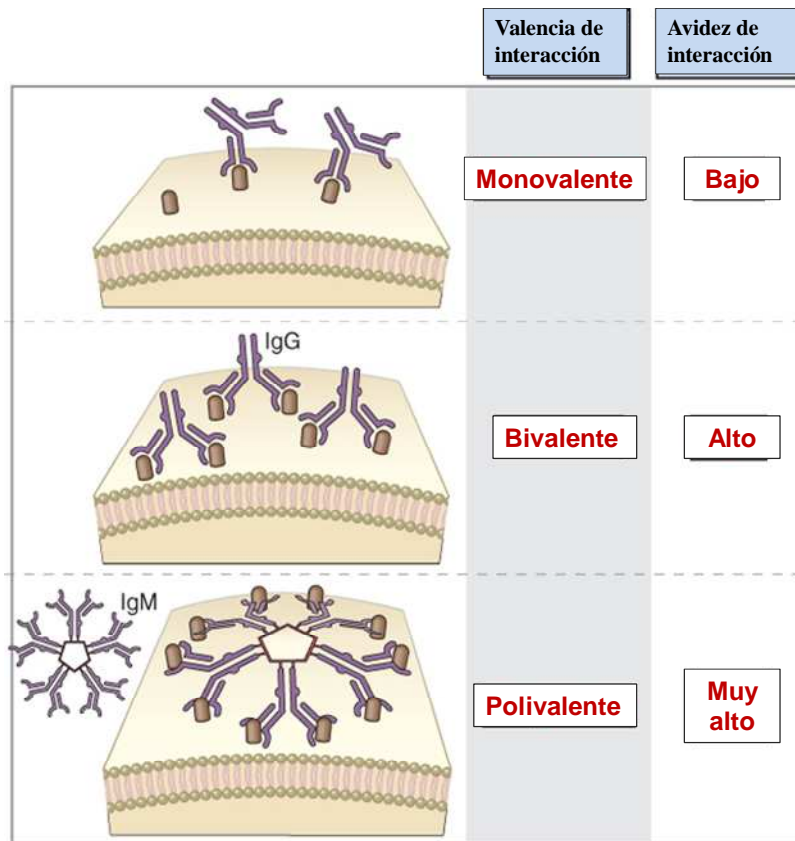
Actualmente, para discriminar el tipo de respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria), la prueba de avidéz de IgG mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) se considera con mayor utilidad que la tradicional prueba de HAI, de acuerdo con el reporte del Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales de la OMS (WHO, 2006). Para separar los anticuerpos de baja avidéz de los anticuerpos de alta avidéz se usan agentes desnaturizantes en ensayos inmunoenzimáticos (EIA) o de ELISA (Kneitz, 2004). Desde los 50's, Anfinsen había demostrado que la urea es un buen agente desnaturizante. Se han propuesto otros agentes desnaturizantes, pero Hedman y Seppälä mostraron que la urea 8M es más eficiente que la acidez (pH: 3-4), el dodecilsulfato de sodio (detergente aniónico) y el tiocianato de potasio (KCNS) para disociar el anticuerpo del antígeno con el propósito de separar los anticuerpos IgG de fase aguda (respuesta primaria) de los anticuerpos IgG producidos por inmunidad previa (respuesta secundaria) en la evaluación de la avidéz de anticuerpos anti-rubéola IgG (1988).

La capacidad de los anticuerpos para reconocer y neutralizar las toxinas y los microorganismos infecciosos depende de la unión estrecha del parátipe (zona de unión) de un anticuerpo y un epítipe (zona de unión) de un antígeno, que se denomina afinidad del anticuerpo. La afinidad se representa por una constante de disociación (K_d) que indica la concentración de antígeno que se necesita para ocupar los sitios de unión de la mitad de las moléculas de anticuerpos presentes en una solución de anticuerpos (Abbas *et al.*, 2008). Debido a que la región bisagra de los anticuerpos proporciona flexibilidad, un solo anticuerpo puede unirse a un antígeno multivalente por más de un punto de unión. Por ejemplo, los anticuerpos IgG presentan dos puntos de unión, uno en cada Fab. En IgM pentaméricas, un solo anticuerpo puede unirse hasta en 10 sitios diferentes (Fig 7). La fuerza de unión global de todos los sitios del anticuerpo a todos los epítipes disponibles del antígeno se conoce como avidéz. Por lo tanto, una molécula de IgM de baja afinidad puede

unirse fuertemente a un antígeno polivalente debido a que muchas interacciones de afinidad baja pueden producir una interacción de avidez alta.

Asimismo, los anticuerpos IgG de baja afinidad que se generan durante la respuesta primaria se reemplazan gradualmente con anticuerpos de mayor afinidad que se van generando mediante cambios sutiles en la estructura del anticuerpo durante las exposiciones subsecuentes al antígeno (Eisen and Siskind, 1964; Werblin *et al.*, 1973). El antígeno estimula preferentemente los linfocitos B que sintetizan anticuerpos de afinidad alta, los cuales se convierten en los linfocitos dominantes. Este proceso, denominado maduración de la afinidad produce un aumento de la afinidad de la unión media de anticuerpos a los antígenos, conforme evoluciona la respuesta inmune humoral (Abbas *et al.*, 2008).

El término afinidad es aplicable sólo a antígenos monovalentes y uniformes que están confinados a condiciones *in vitro*. La afinidad de un anticuerpo (Ac) por un antígeno (Ag) puede medirse directamente mediante la diálisis de equilibrio (Abbas *et al.*, 2008). Este método sólo puede llevarse a cabo cuando el antígeno es pequeño (hapteno), capaz de atravesar con libertad la membrana de diálisis. En contraste, los antígenos virales son grandes, por lo que este método no se puede usar para evaluar la interacción Ag-Ac (Inouye *et al.*, 1984). Para referirse a la fuerza de unión de poblaciones de Ac's al Ag, es preferible emplear el término avidez (afinidad funcional) que emplear el término afinidad (Hedman *et al.*, 1993).



© Elsevier. Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology 6e - www.studentconsult.com

Fig. 7. Valencia y aidez de las interacciones antígeno-anticuerpo. Los Ag's monovalentes o epítomos muy espaciados en la superficie celular interactuarán con un único parátomo de una molécula de Ac. Aunque la afinidad pueda ser alta, la aidez global es relativamente baja. Cuando los epítomos se encuentran suficientemente juntos, los dos parátomos de una molécula de IgG se pueden unir, permitiendo una interacción bivalente con mayor aidez. Las moléculas de IgM tienen 10 lugares de fijación idénticos que, se pueden unir simultáneamente con 10 epítomos en una superficie celular, dando lugar a una interacción polivalente con una aidez muy elevada.

1.8 El hospedero.

La infección causada por el DENV puede producir una gran variedad de manifestaciones clínicas, aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas o subclínicas. Para la aparición de las formas graves de la enfermedad es necesaria la concurrencia de diferentes factores de riesgo tanto individuales, virales como del vector. Los factores de riesgo individuales son importantes porque determinan en parte la severidad de la enfermedad e incluyen: infección secundaria, edad, género, antecedentes genéticos y enfermedades crónicas tales como asma bronquial, drepanocitosis y diabetes (Bravo *et al.*, 1987).

1.8.1 Patogénesis.

La manifestación más severa del DG es la vasculopatía por dengue, que se manifiesta con un incremento en la permeabilidad vascular, favoreciendo una extravasación plasmática al espacio intersticial, produciendo hemoconcentración e hipotensión y finalmente choque hipovolémico. Durante la permeabilidad vascular (por separación de las células endoteliales) no se ha observado necrosis o lesión inflamatoria a nivel endotelial, lo que sugiere que la permeabilidad pueda deberse a una disfunción celular ocasionada probablemente por un mediador de corta acción. El incremento en la permeabilidad ocurre tardíamente durante la infección aguda o próxima a la defervescencia y se propone que coincida con la eliminación del virus lo que podría sugerir que el daño endotelial está mediado por la respuesta del hospedero, más que por el daño tisular directo del virus (Vaughn *et al.*, 2000). A pesar de la elevada morbilidad del DG, aún no se conocen por completo los mecanismos que producen las formas severas de la enfermedad, debido a la falta de un modelo animal apropiado, ya que sólo el humano es capaz de presentar las manifestaciones clínicas severas de la enfermedad (Bente *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que la infección primaria induce inmunidad protectora durante toda la vida para el serotipo causante de la infección (Halstead, 1974), pero sólo induce inmunidad protectora transitoria contra los otros serotipos. Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado que en el curso de una infección secundaria por DENV se incrementa la probabilidad de presentar DG (Sangkawibha *et al.*, 1984; Burke *et al.*, 1988; Thein *et al.*, 1997). Entre las infecciones secundarias que han mostrado una fuerte asociación con el DG la producida por DENV-2 es la mejor documentada (Guzman *et al.*, 2002; Sangkawibha *et al.*, 1984; Thein *et al.*, 1997).

1.8.1.1 DG y amplificación dependiente de anticuerpos (ADA)

El aumento en la severidad del dengue durante una infección heterotípica secundaria puede producirse por un fenómeno denominado amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) (Halstead, 1977; Kliks *et al.*, 1989). Durante una infección secundaria, anticuerpos heterotípicos pre-existentes anti-dengue se unen al DENV infectante debido a que los

diferentes serotipos virales comparten epítomos de grupo, pero no son neutralizantes. De esta manera se forman complejos virus-anticuerpos que se unen al receptor Fc γ R de los macrófagos, facilitando el ingreso del virus a células portadoras del receptor Fc. En consecuencia se incrementa la replicación viral, lo que resulta en una mayor carga viral y la inducción de una sólida respuesta inmune del hospedero, que incluye citocinas y mediadores inflamatorios, algunos de los cuales pueden contribuir al incremento en la permeabilidad vascular (Halstead and O'Rourke, 1977; Kliks *et al.*, 1989). La facilitación de la infección, posiblemente contribuya en el incremento de la viremia observada en la FHD/SCHD (Vaughn *et al.*, 2000). Este incremento en la viremia promueve la activación del complemento, la respuesta de citocinas proinflamatorias que podrían favorecer la presencia de vasculopatía (Vaughn *et al.*, 2000; Avirutnan *et al.*, 2006).

Recientemente, se han desarrollado modelos *in vivo* de ADA en ratones y monos. En estos modelos animales, la transferencia pasiva de anticuerpos anti-DENV se asoció con un incremento en la carga viral sistémica, extravasación plasmática, trombocitopenia y elevados niveles de citocinas (Balsitis *et al.*, 2010). Estos hallazgos confirman la participación de la ADA en el contexto de una infección secundaria heterotípica.

1.8.1.2 DG en primoinfección

Sin embargo, la ADA no explica completamente la patogénesis del DG ya que éste puede ocurrir en el curso de una infección primaria, principalmente por DENV-1 y DENV-3 (Chao *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2011; Duyen *et al.*, 2011; Tricou, 2011). Por otra parte, en el 90-95% de los casos de infección secundaria, no se produce una enfermedad grave, lo que sugiere la participación de otros factores (Guzman y Kouri, 2002; Wichmann *et al.*, 2004). Además, la ADA también ocurre durante la infección de otros ARN virus sin producir hemorragia (Suhrbier and La Lin, 2003; Wallace *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, se han reportado casos de DG en el curso de una infección primaria por DENV, es decir en ausencia de anticuerpos heterotípicos, no neutralizantes pre-existentes (Rosen, 1977; Gubler *et al.*, 1978; Ong *et al.*, 2007). Por lo que se han propuesto otras hipótesis para explicar las manifestaciones severas de la

enfermedad en estos casos. León Rosen, propuso que la variación antigénica (por mutaciones del genoma) de los aislados virales mientras circulan en la naturaleza entre el vector y el humano pueden originar aislados virales más agresivos que participan en el establecimiento de FHD/SCHD (1977). Las evidencias que apoyan esta hipótesis incluyen diferentes estudios de los brotes epidemiológicos que se desarrollaron en las islas del Reino de Tonga en el Pacífico, en los cuales todos los casos se clasificaron mediante serología como infecciones primarias. Mientras que en el brote de 1974 la enfermedad asociada con DENV-1 se clasificó como leve; en 1975 la enfermedad asociada con DENV-2 fue más severa, ya que se presentaron manifestaciones hemorrágicas frecuentes con una tasa elevada de Síndrome de Choque por Dengue. Los autores no pudieron atribuir las diferencias en la severidad de la enfermedad a la susceptibilidad de la población, mosquitos vectores o la presencia de anticuerpos anti-DENV pre-existentes. El aislado viral circulante y su capacidad de causar daño, fueron las probables explicaciones para estos brotes (Gubler *et al.*, 1978). Posteriormente, en la epidemia desarrollada en 1998, en Tainan, Taiwán, producida por DENV-3, los casos de FHD se asociaron con infecciones primarias, pero no con infecciones secundarias (Chao *et al.*, 2004). Además, los resultados de viajeros sugiere que el dengue grave puede ocurrir con similar frecuencia tanto en infecciones primarias, en individuos no inmunes, como en secundarias en áreas endémicas (Meltzer and Schwartz, 2009). Estas evidencias apoyan la hipótesis de la variación antigénica.

1.8.1.3 Papel de los factores virales en la patogénesis del dengue

La posible participación de factores virales en la patogénesis del dengue severo, se ha demostrado por diferentes grupos. El DENV se clasifica en 4 distintos serotipos en base a las propiedades antigénicas, de secuencia y bioquímicas. Cada serotipo presenta varios genotipos. Los genotipos son grupos de DENV estrechamente relacionados genéticamente, pero que presentan a su vez divergencia de secuencia nucleotídica no mayor a 6% dentro de una misma región genómica (Rico-Hesse, 1990). El serotipo DENV-1 presenta 5 genotipos, el DENV-2 tiene 5 genotipos, al DENV-3 se asocian 4 genotipos y se propone que exista un quinto genotipo selvático en Malasia, el cual no se ha aislado aún. DENV-4 presenta 4 genotipos (Weaver and Vasilakis, 2009). Se ha demostrado que aislados virales procedentes

de un mismo brote epidémico, presentan subpoblaciones virales con diferente capacidad de causar daño (capacidad patogénica) en ratones (Sánchez and Ruiz, 1996) y que cambios a nivel del genoma de los aislados virales se asocian con la severidad de la enfermedad (Leitmeyer *et al.*, 1999). Como se menciona en el punto 1.8.1.2., la variación antigénica del virus puede favorecer tanto el potencial epidémico del DENV como la capacidad de producir cuadros clínicos más graves. Por ejemplo, el primer caso de FHD en América apareció en la epidemia de Cuba en 1981. Su aparición se asoció con la introducción de aislados virales procedentes del Sudeste Asiático del DENV-2. Esta etiología fue confirmada mediante el análisis de secuencias parciales genómicas del DENV (Sariol, 1999). Asimismo, mediante estudios de análisis de secuencias llevados a cabo en aislados del DENV-2 obtenidos de plasma de pacientes colectados en diferentes regiones geográficas se ha propuesto que el genotipo asiático está asociado con casos severos de la enfermedad mientras que para el genotipo americano no se pudo encontrar esta asociación (Rico-Hesse *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que las diferencias estructurales en los aislados virales pueden conferir diferentes capacidades para infectar distintos tipos celulares o favorecer una mayor severidad en la enfermedad. Por ejemplo, el cambio en el aminoácido 390 de la proteína E del DENV-2, favorece un incremento en la virulencia (neurotropismo), en un modelo de encefalitis murina experimental (Sánchez and Ruiz, 1996). Asimismo, se ha reportado que diferencias estructurales entre genotipos del DENV-2, se asocian con la expresión de distintas formas clínicas del dengue: El genotipo de Asia Sudoriental con FD y FHD y el genotipo Americano con FD. Los cambios en la posición 390 de la proteína E, modifican la unión del DENV a los receptores celulares. Asimismo, se han reportado mutaciones en los nucleótidos 68-80 de la región 5'-UTR, asociados con la alteración en la iniciación de la traducción de proteínas virales; y en la región 3'-UTR los cuales podrían regular la replicación viral mediante la formación de intermediarios replicativos (Leitmeyer *et al.* 1999).

En diferentes reportes se sugiere que el DENV puede evolucionar en el curso de una epidemia, causando cuadros clínico más severos. Se ha observado un incremento en la gravedad de los casos en la segunda mitad de las epidemias con respecto a la primera

mitad. Esta situación se observó en los brotes en las islas Niue en 1972, en Cuba en 1981 y Australia (Kouri *et al.*, 1987; Streatfield *et al.*, 1993; Rodríguez-Roche *et al.*, 2005). El continuo pasaje del virus entre humanos podría explicar el incremento en la virulencia de los mismos, ya que se encuentran circulando varios años. Asimismo, se ha observado la evolución viral durante una epidemia. La secuencia genómica de 6 aislados del DENV-2 colectados en diferentes momentos en el transcurso de una epidemia mostró sustituciones nucleotídicas en el gen de NS5. Estos cambios se asociaron con la severidad de la enfermedad en el transcurso de la epidemia (Rodríguez-Roche *et al.*, 2005).

También se han descrito la presencia de quasiespecies, que son poblaciones virales con diversidad genética presentes en un mismo hospedero. Las quasiespecies existen como una población con secuencias estrechamente relacionadas dentro de un mismo individuo y son diferentes a los aislados que les dieron origen (Holland *et al.*, 1992). Se sabe que la complejidad en el espectro de las quasiespecies virales puede influenciar tanto la progresión de las enfermedades virales como su patogénesis. Por ejemplo se ha documentado que quasiespecies del virus HIV-1 resistentes a uno ó múltiples antiretrovirales, han conferido capacidad de supervivencia a los virus mutantes (Domingo and Holland, 1997).

La diversidad genética en las cepas virales se produce debido a la incorporación de mutaciones en la cadena de ARN de la progenie viral producidas por la baja fidelidad de las ARN polimerasas, favoreciendo una tasa elevada de mutaciones durante la replicación del genoma viral. El principal factor que contribuye a la incorporación de las mutaciones en la cadena de ARN de la progenie viral, es la ausencia de reparación de errores. Las ARN polimerasas no muestran la actividad 3' ó 5' exonucleasa, como en el caso de la ADN polimerasa (Domingo and Holland, 1997).

Los factores virales también desempeñan un papel fundamental en la expresión de los diferentes cuadros clínicos de la enfermedad, al igual que los factores del hospedero (Martina *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

Los mecanismos que favorecen la aparición de las formas severas del dengue aún no están totalmente dilucidados. Se propone que la coincidencia tanto de factores virales, del huésped, epidemiológicos y del vector (Guzmán *et al.*, 2006) incrementan el riesgo de la instalación de los casos severos de la enfermedad (Halstead, 1977; Rosen, 1977). Como ya se mencionó, existen dos hipótesis que intentan explicar la FHD/SCHD. La hipótesis de Halstead (1977) quien propone que la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes en el curso de una infección secundaria, puede resultar en un incremento de la infección. Sin embargo, se han reportado epidemias de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria (es decir en donde NO existe inmunidad previa), por lo que León Rosen, ha propuesto (segunda hipótesis) que la variación antigénica de los aislados virales mientras circulan en la naturaleza (entre el vector y el humano) son un factor determinante en la presentación de FHD/SCHD (Rosen, 1977). Nosotros planteamos que ambas hipótesis no son excluyentes y que la patogénesis de la enfermedad es el resultado de las interacciones tanto de factores del huésped (inmunidad previa, factores genéticos, etc.), factores ento-epidemiológicos (población primoinfectada, competencia vectorial, alta densidad del vector, etc.) como factores virales (variación antigénica, incremento en la capacidad de replicación, virulencia).

Los factores tanto del huésped como epidemiológicos han sido ampliamente estudiados (Halstead, 1977; Huang *et al.*, 2001). Sin embargo, existen pocos trabajos referentes al estudio de los posibles factores virales (porque no existe un modelo animal que reproduzca la enfermedad) asociados a la patogénesis del dengue. La participación de niveles elevados del virus en la severidad de la enfermedad ha mostrado resultados contradictorios. En estudios iniciales se reportó que la viremia, evaluada mediante aislamiento viral, no se asociaba significativamente con la severidad de la enfermedad (Gubler *et al.*, 1979, 1981). Sin embargo, un estudio más reciente llevado a cabo en 20 adultos infectados por DENV-3 mostró que la carga viral en pacientes con FHD, permanecía elevada durante la fase de defervescencia en contraste con los pacientes de FD, esta fase es una etapa crítica en la progresión de la severidad de la enfermedad. La carga viral en el suero de estos pacientes, fue evaluada mediante RT-PCR en tiempo real (Wang *et al.*, 2003). Ahora bien, en un escenario distinto, un estudio en Brasil en 185 adultos infectados principalmente por

DENV-3 mostró que la viremia, evaluada mediante RT-PCR en tiempo real, permaneció elevada posterior a la defervescencia entre los pacientes con enfermedad severa. Debido a las dificultades para aplicar estrictamente los criterios de la clasificación de 1997, los pacientes se clasificaron en 3 grupos: FD, FD/FHD intermedio y FHD (Guilarde *et al.*, 2008). En este estudio, Guilarde y colaboradores mostraron además la falta de asociación entre la severidad de la enfermedad y la respuesta secundaria de anticuerpos, sugiriendo que las infecciones primarias por DENV-3 podrían producir la enfermedad grave en adultos; lo cual contrasta con los reportes que mostraban que el serotipo 2 del DENV podría asociarse con la severidad de la enfermedad, a diferencia de los otros serotipos virales (Vaughn *et al.*, 2000; Endy *et al.*, 2004). En el estudio de Guilarde, la inclusión de pocos pacientes durante la defervescencia en el grupo de FD impide la valiosa comparación de estos pacientes con los que presentarían las formas severas de la enfermedad.

Por lo tanto, la persistencia de niveles elevados del DENV durante la transición de la fase febril a la defervescencia puede ser un factor de riesgo en la severidad del dengue (el retraso del aclaramiento de la viremia podría contribuir en la patogénesis de la FHD) (Guilarde *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos que favorecen la aparición de las formas severas del dengue aún no están totalmente dilucidados, debido a la falta de un modelo animal que reproduzca las manifestaciones severas de la enfermedad como ocurre en el humano. Entre los factores de riesgo a DG inherentes tanto al agente etiológico como al huésped (relación huésped parásito), los niveles elevados y sostenidos de viremia (retraso en el aclaramiento de la carga viral), durante la transición de la fase febril a la etapa de defervescencia, se ha asociado como uno de los principales factores de riesgo que predisponen al establecimiento de las formas más severas de la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue evaluar los factores virales y del hospedero que pudieran participar en el desarrollo de casos severos de dengue en el marco de la clasificación de la OMS de 2009. Ningún estudio previo ha aplicado la clasificación de la OMS de 2009 en México, donde la FD es endémica en 28 de 32 estados.

4. HIPÓTESIS

Factores virales (viremia elevada, retraso en el aclaramiento del DENV) y del hospedero (respuesta secundaria de anticuerpos), puede ser un factor de predisposición al establecimiento del Dengue Grave en los casos desafortunados de la enfermedad.

5. OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la caracterización de un brote epidemiológico de dengue ocurrido en el Centro de Chiapas, México, en 2009, para evaluar la posible participación de diferentes factores de riesgo, en pacientes que presentaron DG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.1. Describir las características clínicas y epidemiológicas de un brote epidémico de dengue ocurrido en el Centro de Chiapas en 2009.
- 5.2. Evaluar el desempeño de dos diferentes clasificaciones de caso de dengue de la OMS (1997 y 2009) para poder clasificar de manera adecuada los casos severos del dengue en el brote epidemiológico en estudio.
- 5.3. Determinar si la severidad de la enfermedad depende del serotipo infectante.
- 5.4. Determinar la relación entre la carga viral en el suero de pacientes y la severidad de la enfermedad (ya sea en la fase febril y crítica como en la fase de recuperación).
- 5.5. Determinar la relación entre la respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria) en el hospedero y la severidad de la enfermedad.

6 ESTRATEGIAS Y MÉTODOS

6.1 Estudio Epidemiológico:

REGIÓN DE ESTUDIO.- Para evaluar las características epidemiológicas en el brote de dengue ocurrido en el Centro de Chiapas en 2009 (Fig. 8), se llevó a cabo un estudio epidemiológico transversal, prospectivo. Chiapas se localiza al sureste de México, colinda al norte con el estado de Tabasco, al oeste con Veracruz y Oaxaca, al sur con el Océano Pacífico y al este con la República de Guatemala. La zona Centro de Chiapas se ubica en la Depresión Central del estado (DCCh), a una altitud de 400 a 800 metros sobre el nivel del mar (msnm) (GECH, 2005). En la región se presenta un régimen de lluvias de verano, que define dos tipos de clima, uno cálido subhúmedo con temperatura media anual de 22.8-25.8 °C, la precipitación pluvial promedio varía entre 660 y 1051 mm anuales. El otro es el clima parcialmente cálido, subhúmedo que se encuentra en los declives de las cadenas montañosas adyacentes al valle central. La precipitación varía entre 1,110 y 1,267 mm anuales y temperatura debajo de los 23 °C (García, 1988). La mayor precipitación se concentra en los meses de junio a septiembre. En la DCCh y zonas adyacentes la lluvia declina a partir de octubre y llega a ser muy escasa entre noviembre y abril. La zona Centro está integrada por 22 municipios, pero no se obtuvo la cooperación de todas las unidades médicas, por lo que algunos municipios no fueron considerados en el estudio.

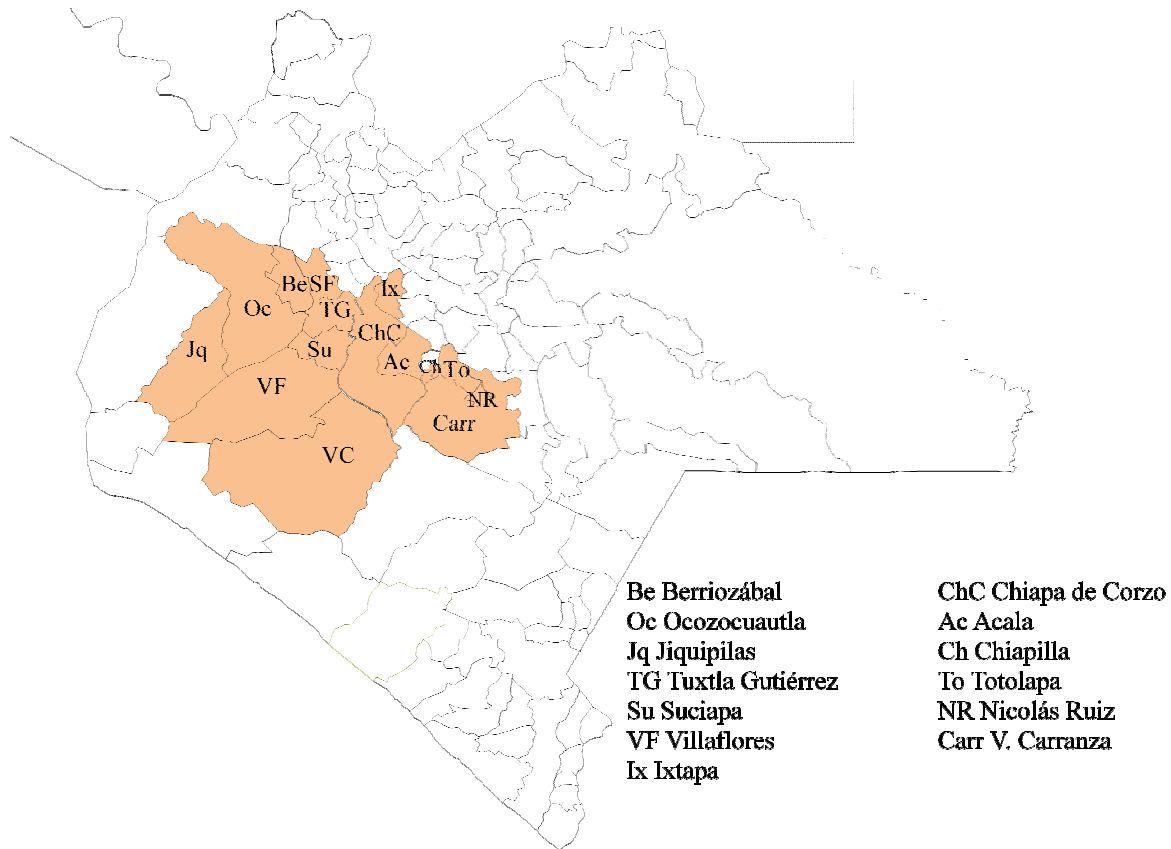


Fig. 8. Región de estudio. Se muestran los municipios de la zona Centro de Chiapas, cuyas unidades médicas fueron consideradas en el estudio. Adaptado de GECH, 2005.

POBLACION DE ESTUDIO.- Los pacientes reclutados en el presente estudio, reunieron los siguientes criterios de inclusión: ser mayores de un año de edad, que presentaran un síndrome febril compatibles con las distintas formas clínicas de dengue, ya sea con cuadro de FD, FHD o SCHD y la aceptación de la participación en el estudio mediante la firma del consentimiento informado y que solicitaran los servicios de atención médica en Hospitales y Centros de Salud públicos de la zona Centro de Chiapas, así como en el Módulo Sanitario instalado en el Palacio de Gobierno debido a que la etapa de colecta de muestras, coincidió con la contingencia sanitaria por la pandemia de la influenza AH1N1. Las muestras se obtuvieron durante el periodo de mayo a octubre de 2009, todos los días de la semana. Se excluyeron los pacientes menores de 1 año debido a la alta probabilidad de presentar un síndrome febril por un agente patógeno diferente al dengue, también se excluyeron del estudio los pacientes con evidencia clínica o por laboratorio de tener otras enfermedades que explicaran parcial o totalmente la enfermedad que presentaban.

Durante la obtención de la información clínica y epidemiológica, un epidemiólogo especialista en el tema, interrogó y exploró a todos los participantes del estudio. La información clínica y epidemiológica se registró en el formato de Estudio epidemiológico de caso de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue de la Secretaría de Salud. Para llevar a cabo las pruebas serológicas, se obtuvieron muestras de 4 ml de sangre periférica en tubos sin anticoagulante durante las fases febril y de defervescencia, las cuales se almacenaron a -50°C hasta su uso. Los casos fueron confirmados mediante la detección de antígeno NS1 o anticuerpos anti-dengue IgG e IgM. El día del inicio de la fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) se definió como el día 1 de la enfermedad. El día en que ocurre la defervescencia (cuando la temperatura desciende por debajo de 38°C y ya no vuelve a subir) fue definido como día 0; los días anteriores a éste, es decir, cuando existe fiebre fueron definidos con números negativos (-1, -2, -3); mientras que los posteriores fueron definidos con números positivos (+1, +2, +3, etc.). Los pacientes fueron observados durante su hospitalización y monitoreados con pruebas de laboratorio de rutina como biometría hemática y examen general de orina. Todos los pacientes confirmados se clasificaron de acuerdo a la severidad de la enfermedad utilizando los criterios de la OMS: Fiebre o historia reciente de fiebre aguda, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia (recuento plaquetario $\leq 100,000$ plaq/ μl), evidencia objetiva de aumento en la permeabilidad vascular (hemoconcentración $\geq 20\%$, ascitis o efusión pleural) (WHO, 1997). Con objeto de evaluar el desempeño de las diferentes clasificaciones de caso de dengue de la OMS (1997 y 2009) para la detección de casos severos de dengue en el brote epidemiológico en el Centro de Chiapas de 2009; los casos también fueron reclasificados de acuerdo con la clasificación de 2009, descrita anteriormente. En la evaluación de la sensibilidad/especificidad de ambas clasificaciones, se consideró el nivel de intervención clínica que el paciente requirió para su tratamiento (Narváez *et al*, 2011; Alexander *et al*, 2011). En el Nivel I se agruparon los pacientes ambulatorios (que no requirieron hospitalización). En el Nivel II, los pacientes hospitalizados que recibieron fluidos intravenosos para su rehidratación o mantenimiento. En el Nivel III, pacientes que fueron hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), que recibieron oxígeno terapia o que se les administraron fármacos inotrópicos o hemocomponentes.

CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.- Para obtener información estadísticamente confiable y significativa, se determinó el tamaño de la muestra respecto del universo de estudio. Para calcular el tamaño muestral se utilizó la técnica de muestreo probabilístico que nos permitió obtener información representativa, válida y confiable al menor costo. El tamaño mínimo de muestra se calculó usando la fórmula para poblaciones indeterminadas propuesta por Daniel (Whitley & Ball, 2002):

$$n = \frac{Z^2 \cdot pq}{d^2}$$

En donde:

n = Tamaño de la muestra

Z = Estadístico Z para un nivel de confianza 95% = 1.96

p = Proporción esperada

q = 1-p

d = error de estimación 5% = 0.05

La proporción esperada es la proporción de la población con prevalencia de dengue. Se asignó el valor de 0.5 (50%) tanto a la proporción esperada (p) como a la proporción no esperada (q), debido a que en Chiapas no se cuenta con valores de prevalencia y que en México la prevalencia es muy variable en los estudios existentes (0.796 en un estudio desarrollado en Veracruz en 2003, 0.091 en Tabasco en 2005) (Navarrete-Espinosa *et al.*, 2006; Sánchez-Burgos *et al.*, 2008), mientras que en donadores, la frecuencia de anticuerpos IgG fue d 0.02 (Rodríguez-Rodríguez, 2009).

6.2 Determinación de la respuesta (primaria o secundaria) de anticuerpos mediante ensayo de avidéz de IgG.

Para determinar entre una respuesta inmune primaria o respuesta secundaria, se utilizó el ensayo de avidéz de anticuerpos anti-dengue (IgG). Para llevar a cabo la separación de anticuerpos de baja y alta avidéz en los ensayos de ELISA, los sueros se incubaron previamente con urea 7 molar como agente desnaturizante como a continuación se indica (Kneitz, 2004). La detección de anticuerpos anti-DENV, se llevó a cabo utilizando un kit

comercial (Dengue ELISA IgG kit, Focus Technologies, Cypress, CA, USA). Este ensayo es específico para IgG (fragmento Fc) el cual usa un conjugado de peroxidasa de rábano con tetrametilbencidina (TMB) como cromógeno. Los micropozos de poliestireno cubiertos con proporciones iguales de los cuatro serotipos del DENV permiten que los anticuerpos específicos presentes en la muestra se unan con el antígeno. En el presente ensayo, se agregaron por duplicado 100 μ L tanto de las muestras séricas (dilución 1:101) como de los controles. Las placas se incubaron a 20-25°C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con buffer de lavado. Para separar los anticuerpos de menor avidéz, la mitad de los pozos se incubaron con 100 μ L de una solución salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7.2 que contenía urea 7 M, durante 10 minutos, el resto de los pozos se incubaron con 100 μ L de PBS sin urea (De Souza *et al.*, 2004). Los pozos se lavaron 2 veces como antes se indicó. Posteriormente, se agregaron 100 μ L del conjugado de anticuerpos anti-IgG-peroxidasa que reacciona con la IgG específica. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, y se lavaron 5 veces para remover el conjugado. Posteriormente, se agregaron 100 μ L del substrato (H_2O_2) y el cromógeno (TMB) para permitir el desarrollo del color, incubando las muestras 10 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregaron 100 μ L de H_2SO_4 . Finalmente, las muestras se evaluaron por espectrofotometría a 450 nm en un lector de densidad óptica para ELISA. El índice de avidéz, se representó en porcentaje y se calculó como la razón de la densidad óptica con urea a la densidad óptica sin urea por 100. Se utilizó el esquema de urea 7 M durante 10 min, en base a que son condiciones ya previamente establecidas para evaluar la avidéz de IgG durante la infección por los virus de dengue y sarampión con una sensibilidad del 100% y especificidad 97.8% (De Souza *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2007).

Para calcular el índice de avidéz, expresado como porcentaje, se usó la siguiente fórmula:

$$I_a = \frac{DO_{urea}}{DO_{sin\ urea}} \times 100$$

1 El índice del control detectable varía de 1.5 a 3.5

2 El índice del control no detectable debe ser menor que 0.8

Si el calibrador o los controles no estaban dentro de estos parámetros, los resultados fueron considerados inválidos, por lo que debía repetirse el ensayo.

Interpretación de los resultados

Se reportaron los resultados de las muestras como índice de avidéz. Para determinar el tipo de respuesta de anticuerpos se utilizó el siguiente valor de corte (Tabla 1):

Tabla 1. Valor de corte del índice de avidéz de Ac's IgG

Índice de avidéz	Tipo de respuesta de anticuerpos
≥ 24.00	Secundaria.
< 24.00	Primaria.

(De Souza, 2004)

6.3 Extracción del RNA viral:

El RNA del DENV se purificó a partir de cada una de las muestras de suero obtenidas en el presente estudio. El RNA viral se extrajo por duplicado a partir de 140 μ l de suero usando el QIAamp Viral RNA Kit. Posteriormente, el RNA viral se eluyó con 60 μ l de buffer de elución de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2005).

6.4 Tipificación del virus dengue (Método de Lanciotti)

La tipificación de los aislados del DENV se llevó a cabo mediante RT-PCR de punto final, utilizando el RNA viral purificado a partir del suero de pacientes con dengue. Brevemente, la retro-transcripción se llevó a cabo utilizando 1 μ L del iniciador D2, 0.5 μ L de la enzima MMLV reverse (PROMEGA), 0.5 μ L de una mezcla de desoxinucleótidos (cada uno a una concentración final de 0.122 mM) y 15 μ L del RNA molde, en un volumen final de 20.5

μL. Para verificar la especificidad de la reacción y evidenciar una posible contaminación cruzada, se usó agua con dietilpirocarbonato (DEPC) como control negativo.

La tipificación de los aislados virales en las muestras séricas, se llevó a cabo de acuerdo al método de Lanciotti (Lanciotti *et al.*, 1992). Para el primer ciclo de PCR se utilizaron los iniciadores consenso D1 y D2 que reconocen una secuencia consenso que corresponde al sitio de unión entre las proteínas de la cápside y la premembrana (C/prM) de aislados virales geográficamente diferentes. Posteriormente, se llevó a cabo un segundo ciclo de PCR anidado con el iniciador D1 y los iniciadores específicos de serotipo TS1, TS2, TS3 y TS4, los cuales fueron diseñados para reconocer secuencias específicas para cada tipo viral (Lanciotti *et al.*, 1992). Para optimizar la segunda reacción de amplificación se hicieron diferentes modificaciones al protocolo original, las cuales se describen a continuación: En el segundo ciclo de amplificación se utilizaron 3 μL del producto de la reacción inicial diluido 1:10 en agua pentadestilada. Asimismo, se usaron 0.8 μL de una mezcla de desoxinucleótidos (cada uno a una concentración final de 0.133 mM) y 1.7 μL de MgCl₂ para obtener una concentración final de 1.4 mM. Finalmente, el programa de amplificación que utilizamos incluyó; 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s) de unión del iniciador (54°C, 40 s) y extensión (72°C, 40 s) en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). La especificidad de las reacciones de RT y PCR, se determinó descartando una posible contaminación cruzada, para lo cual se usó agua con dietilpirocarbonato (DEPC) como control negativo en cada experimento. Para determinar la sensibilidad del ensayo como controles positivos se usaron plásmidos de DENV-1, DENV-3, DENV-4 y el ARN viral de la cepa Nueva Guinea del DENV-2 (D2NGC).

La estimación del tamaño de los productos de amplificación se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.2% en Tris-acetato-EDTA (TAE 1X), utilizando una cámara de 40 pozos (BIORAD Sub-cell GT WIDE MINI) a 90V durante 1.3 horas. En la concentración al 2.2% observamos la mejor resolución de las bandas (TS1 (482 pb), TS2 (119 pb), TS3 (290 pb), y TS4 (392 pb)), las cuales correspondían al tamaño del peso esperado para cada tipo de DENV.

6.5 Determinación de la carga viral mediante PCR en tiempo real:

La cuantificación de la carga viral en las muestras, se hizo mediante RT-PCR en tiempo real de un solo paso (StepOne; Applied Biosystems). Para la amplificación de la región 3'RNT del RNA del DENV, utilizamos una sonda que reconocieran una secuencia altamente conservada del genoma de los diferentes tipos del DENV (Gurukumar, 2009). La posición de esta región dentro del genoma de cada serotipo se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Posición de la 3'RNT en los serotipos del DENV.

Serotipo	Extremo 5' (nt)	Extremo 3' (nt)
DENV-1	10230	10700
DENV-2	10301	10708
DENV-3	10243	10689
DENV-4	10315	10635

El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa Multalin versión 5.4.1, con el cual se encontró un porcentaje de similitud superior al 90%. La secuencia utilizada para el diseño de los primers fue la siguiente:

5' AATTAACATGAGACAAGATTAGAAGTCAGGTCGGATTAAGCCATAGTACGGA
AAAAACTATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTTAAAAGAAGTCAGGCC
ACTACAAGTGCCATAGCTTGAGCAAACTATGCAGCCTGTAGCTCCACCTGGGA
AGGTGTA AAAAATCTGGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCGTA
GTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTGCAAGTCGCAGCAACAATGGG
GGCCCAAGGTGAGGTGAAGCTGTAATCTCACTGGAAGGACTAGAGGTTAGAGG
AGAGAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGATCCTGCTGT
CTC3'

Con base en la secuencia anterior se diseñaron y sintetizaron (en la compañía Applied) los siguientes iniciadores:

PRIMER FORWARD	3-UTR-DENV_F	CTGGGAGGCCACAAACCAT
PRIMER REVERSE	3-UTR-DENV_R	TCCTCTAACCGCTAGTCCACTAC
PROBE	3-UTR-DENV_M FAM	CCATGCGTACAGCTTC

Los diferentes ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un equipo Step-One (Applied Biosystems) utilizando la sonda marcada con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM). Debido a que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta es proporcional a la cantidad de DNA molde, el sistema permite determinar el incremento del amplicón a lo largo de la reacción de PCR en cada ciclo de amplificación. En cada ensayo utilizamos 5 µL del eluido del RNA obtenido en el paso 5.2.1 agregándolos a la mezcla maestra de reactivos One-Step RT-PCR Master-Mix Reagents kit (Applied Biosystems) para un volumen final de 20 µL. Las muestras se analizaron en el sistema de RT-PCRq de un solo paso. Este sistema acopla una reacción de retrotranscripción previa al PCR, permitiendo la síntesis del DNA complementario (cDNA) a partir del RNA viral, utilizando la retrotranscriptasa recombinante Multiscribe del Moloney Murine Leukemia Virus (rMoMuLV). El cDNA se usó como DNA molde para la amplificación del producto mediante la PCR en tiempo real.

Cada corrida incluye una curva patrón que se generó a partir de una solución estándar de virus dengue (cepa D2NGC) titulada mediante ensayo de placa lítica; de la cual se hicieron 5 diluciones sucesivas 1:10.

6.6 Análisis estadístico de los datos.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de las variables cuantitativas, se determinaron tanto la media como la desviación estándar, mientras que para las variables cualitativas se calcularon las frecuencias de cada categoría. En la comparación de los grupos utilizamos la prueba exacta de Fisher y se calculó la razón de momios (odds ratio, OR). Las medias entre dos o tres grupos se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis con pos-prueba de comparación múltiple de Dunn, respectivamente. Adicionalmente, para evaluar la sensibilidad y especificidad del recuento plaquetario en la detección de casos de SD se utilizó el análisis de la curva de características del operador del

receptor (ROC). Se seleccionaron diferentes valores umbrales y se estimaron la S y la E en cada uno de ellos. Posteriormente, se hizo una representación gráfica de la S en función de 1-E. La prueba ideal se indicó en el ángulo superior izquierdo de la gráfica (S y E = 1). En contraste, una prueba sin ningún valor se indicó en la diagonal que va del ángulo inferior izquierdo al ángulo superior derecho (en donde cada incremento de S se asocia a una pérdida de E de igual magnitud). De esta forma, S y E son valores interdependientes, en donde conforme aumenta la S disminuye E y viceversa. Si se adoptan criterios de diagnóstico muy estrictos disminuye S (hay menos enfermos que cumplen estos criterios), y paralelamente aumenta E (pocos sanos cumplen estos criterios). Para describir la asociación entre las manifestaciones clínicas y la severidad de la enfermedad se hizo un análisis de correspondencia. El análisis cualitativo entre las diferentes manifestaciones clínicas y la severidad de la enfermedad se llevó a cabo mediante análisis de correspondencia (AC), que es una herramienta descriptiva útil en la definición de patrones de asociación entre variables definidas dentro de una población. Por ejemplo, de acuerdo al mes de aparición de la enfermedad (Julio-Octubre) y la severidad de la misma (D-SA, D+SA y DG) se pudo determinar el porcentaje de casos de acuerdo tanto a la severidad del Dengue como al mes en que se registró. Debido a que el AC representa una herramienta descriptiva útil para asociar variables categóricas o nominales, se pudo describir la tipología específica entre diferentes signos y síntomas de la enfermedad y su grado de severidad. Asimismo, mediante la prueba X^2 se determinó la asociación entre dos variables a partir del cálculo de la distancia entre ellas. De tal manera que para cada grado de severidad, el AC se utilizó para calcular el puntaje de cada categoría con respecto a la combinación de los patrones de severidad, lo cual generó las dimensiones 1 y 2 que a su vez definen escalas de variación y dispersión de los casos con respecto a la asociación de severidad. La representación gráfica de los porcentajes de casos dentro del AC se mostró por medio de puntos dispersos en las dimensiones definidas; cada punto muestra el resultado de los puntajes obtenidos con respecto a la asociación de los patrones de severidad. Es decir, a mayor proximidad entre dos categorías de variables, mayor asociación o correspondencia tienen entre sí. Lo contrario indica la falta de correspondencia entre las variables.

Asimismo, se evaluó la concordancia o correspondencia en la detección de casos severos entre las clasificaciones de 1997 y 2009 mediante el Índice Kappa. Un valor Kappa de 0.00

de acuerdo a Landis (1977) se considera con “pobre concordancia”, un valor de 0.00-0.20 como “leve concordancia”; valores entre 0.21-0.40 tienen “concordancia razonable”; 0.41-0.60; “concordancia moderada”; 0.61-0.80; “concordancia sustancial” y 0.81-0.90 “concordancia casi perfecta”.

Para evaluar la razón costo-beneficio (CBR) entre ambas clasificaciones, el Beneficio (B) se definió por el incremento en sensibilidad para detectar casos de DG. Es decir, B se definió por el cociente de casos de DG detectados de acuerdo a los criterios de la clasificación de 2009, divididos entre los casos de FHD grados III-IV detectados de acuerdo a los criterios de la clasificación de 1997. El Costo (C) se definió por la sobrecarga en las unidades de salud, causada por pacientes que requirieron ser internados para su atención. Es decir, C se definió por el cociente de los casos de D+SA más los casos de DG de acuerdo a la clasificación de 2009, divididos entre los casos de FHD detectados de acuerdo con los criterios de la clasificación de 1997. De acuerdo con lo anterior, la $CBR = C/B$. Para evaluar la posible relación entre la viremia y el grado de la severidad de la enfermedad de acuerdo con el tiempo, utilizamos dos estrategias: Inicialmente, se describió el nivel de carga viral en relación al inicio de la enfermedad y posteriormente se describió el nivel de carga viral en relación a la defervescencia. El día de inicio de la enfermedad (DIS), se definió como el día de inicio de fiebre. En relación a la defervescencia, el día “0” se definió como el día de disminución de la fiebre; el día “-1” fue definido como el día antes de la defervescencia y el día “+1” se definió como el día después de la defervescencia. La relación entre la carga viral y el tiempo (días de enfermedad o día de defervescencia) se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple. Del conjunto de datos, se utilizó el valor promedio de los casos registrados a los diferentes días estudiados, de esta forma se obtuvo la relación funcional que se definió como la ecuación de la recta de mejor ajuste para cada par de variables. Asimismo, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson para medir la asociación lineal entre las variables evaluadas. En cualquier caso se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. El análisis de los datos se llevó a cabo con ayuda de los programas estadísticos Prism 5.03 (Graph Pad Software, Inc., USA) y SAS 9.0 (SAS Intitute, Inc., USA).

Asimismo, se llevó a cabo un análisis de regresión logística para determinar factores de

riesgo asociados a la probabilidad de discriminar entre pacientes con SD vs D±WS de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2009. Utilizamos como conjunto de variables predictoras: a) La fase de la enfermedad (Tóxica o Defervescencia), b) El tipo de infección (Primaria o Secundaria), c) El nivel de viremia (Bajo; < 3.5 , o Alto; $> 3.5 \text{ Log}_{10}$ copias/ μL) y d) El recuento plaquetario (Bajo; $< 35,000$, o Alto; $> 35,000 \text{ plaq}/\mu\text{L}$). Estas variables se seleccionaron después de haber evaluado el total de variables incluidas en nuestro estudio. La bondad de ajuste del modelo se hizo mediante los análisis estadísticos de Desviación y de Pearson, en ambos casos se rechazó la existencia de desviación ($p > 0.05$). El efecto de las variables predictoras se consideró significativo ($p < 0.05$) de acuerdo al análisis de efectos tipo III de Wald. Se presentó una correlación muy elevada (72.8%) entre los eventos pronosticados y las respuestas observadas. La regresión logística se llevó a cabo utilizando el módulo Proc Logistic incluido en el programa estadístico SAS 9.0.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización epidemiológica de la población estudiada

Se reclutaron 630 individuos que reunieron los criterios de inclusión en Hospitales y Centros de Salud públicos en el Centro de Chiapas, México, durante un brote epidémico de dengue, ocurrido entre los meses de mayo a octubre de 2009. Del total de pacientes, 141 (23.4%) fueron excluidos del estudio por tener pruebas serológicas negativas para dengue: Detección de NS1, IgM anti-dengue y/o IgG anti-dengue o por presentar etiología diferente al dengue. De acuerdo a lo anterior, nuestra población de estudio fue de 489 pacientes (77.6%) confirmados por serología (NS1, IgM, IgG). Los datos clínicos de los 489 pacientes fueron analizados estadísticamente. La edad de los pacientes fluctuó entre 0.4 y 79 años. (Media = 25, desviación estándar = 15). El 30.9% de la población de estudio tenía una edad ≤ 15 años, es decir que tanto los niños como los adultos fueron afectados. El dengue grave fue significativamente más frecuente que el dengue no grave en el grupo de edad de 9-16 años de acuerdo con la prueba exacta de Fisher ($P=0.0341$, $OR=1.661$, $95\%CI=1.043-2.645$). (Tabla 3). Del total de la población en estudio, 236 (48.3%) pertenecían al género femenino y 253 (51.7%) al género masculino. La proporción entre los

géneros en la población de estudio no mostró diferencias significativas de acuerdo con la prueba exacta de Fisher (P=0.5222) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de la población de estudio por grupo de edad.

Grupo etéreo (años)	Dengue No Grave		Dengue Grave		TOTAL	
	n	%	n	%	N	%
0-8	32	8.56	12	10.43	44	9.00
9-16**	83	22.19	40	34.78	123	25.15
17-24	100	26.74	29	25.22	129	26.38
25-32	46	12.30	18	15.65	64	13.09
33-40	41	10.96	11	9.57	52	10.63
41-48	26	6.95	3	2.61	29	5.93
49-56	24	6.42	1	0.87	25	5.11
57-64	14	3.74	0	0.00	14	2.86
65-72	7	1.87	1	0.87	8	1.64
73-80	1	0.27	0	0.00	1	0.20
	374	100.00%	115	100.00	489	100.00

P=0.0096, prueba exacta de Fisher. ** El grupo de 9-16 años es significativamente más susceptible que el resto de la población para presentar la forma grave de la enfermedad.

Tabla 4. Distribución de los casos de dengue por género.

	Dengue grave		Dengue no grave		TOTAL	
	n	%	N	%	N	%
Masculino	63	54.8	190	50.8	253	51.7
Femenino	52	45.2	184	49.2	236	48.3
	115	100	374	100.00	489	100

P=0.5222, prueba exacta de Fisher. No existen diferencias significativas entre géneros en relación a la presentación de la forma grave de la enfermedad.

La duración del periodo febril de los pacientes presentó un rango de 1 a 10 días. Debido a que los pacientes acuden tardíamente a solicitar los servicios de salud, únicamente el 27.4% fue reclutado en la fase febril.

El tiempo de presentación de los pacientes a las unidades médicas para solicitar atención médica en relación con el día de inicio de la enfermedad fue más tardío en los casos de D+SA (media=3.857 días) y DG (media=3.917 días) que en los casos de D-SA (media=2.774 días), de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis con posprueba de comparación múltiple de Dunn (P=0.0001).

7.1.1 Características clínicas

Para evaluar la relación entre la presentación de las manifestaciones clínicas y el grado de severidad del dengue, se aplicó el análisis de la diferencia de dos proporciones independientes, observando lo siguiente: Las manifestaciones clínicas que se presentaron tanto en casos de DG como de D±SA con mayor frecuencia son: fiebre, cefalea, mialgias y artralgias, las cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Interesantemente, el dolor retro-ocular se presentó significativamente (z=2.19) con mayor frecuencia en DG (79%) que en D±SA (69%). El exantema se presentó significativamente (z=2.4) con mayor frecuencia en DG (53%) que en D±SA (40%). El vómito se presentó

significativamente ($z=24.96$) con mayor frecuencia en DG (34%) que en D±SA (10.2%). El dolor abdominal no se observó en D±SA. En contraste, esta manifestación clínica se presentó en el 29% de los casos de DG, por lo que constituye un signo de alarma muy importante ($z=6.7$). La epistaxis se presentó significativamente ($z=4.91$) con mayor frecuencia en DG (32%) que en DNG (8.9%). La gingivorragia se presentó significativamente ($z=2.43$) con mayor frecuencia en DG (19%) que en dengue no grave (9.2%).

La extravasación plasmática se observó en 62 (56.9%) de los pacientes con DG. Las hemorragias se observaron en 40 (36.7%) de los pacientes con DG. Se observó un deterioro grave de órganos como hepatomegalia en 4 (3.7%) de los pacientes con DG. Trastornos hemorrágicos como, hematemesis, melena y metrorragia se presentaron respectivamente en 23 (21.1%), 11 (10.1%) y 8 (7.3%) de los pacientes con SD. Ninguna de estas alteraciones hemorrágicas se observaron en pacientes con D±WS. Interesantemente se observó un recuento plaquetario $\leq 10,000$ plaq/ μ L en 10 (9.2%) de los pacientes con DG en ausencia de los 3 criterios para la clasificación como DG.

Para evaluar la presentación de los signos y síntomas de acuerdo con la severidad de la enfermedad, se hizo un análisis de correspondencia con los siguientes resultados: Las manifestaciones clínicas más frecuentes tanto en DG como en D±SA fueron fiebre, cefalea, mialgias y artralgias. Sin embargo, se observó una correspondencia más estrecha entre el DG y la presencia de exantema y/o dolor retro-orbital. Además se observó una correspondencia más estrecha entre D-SA y ausencia de artralgia o mialgia (Fig. 9A).

Con respecto a los signos de alarma, se observó una correspondencia más estrecha entre el vómito persistente y el DG y entre el dolor abdominal y el DG. Estos hallazgos confirman la importancia de estas manifestaciones clínicas como factores de riesgo para la progresión de la enfermedad (Guzmán *et al.*, 1999; Rigau-Pérez & Laufer, 2006). En contraste, el D-SA se distinguió por una estrecha correspondencia con la ausencia de vómito persistente, dolor abdominal, diarrea, náuseas o dolor lumbosacral (Fig. 9B).

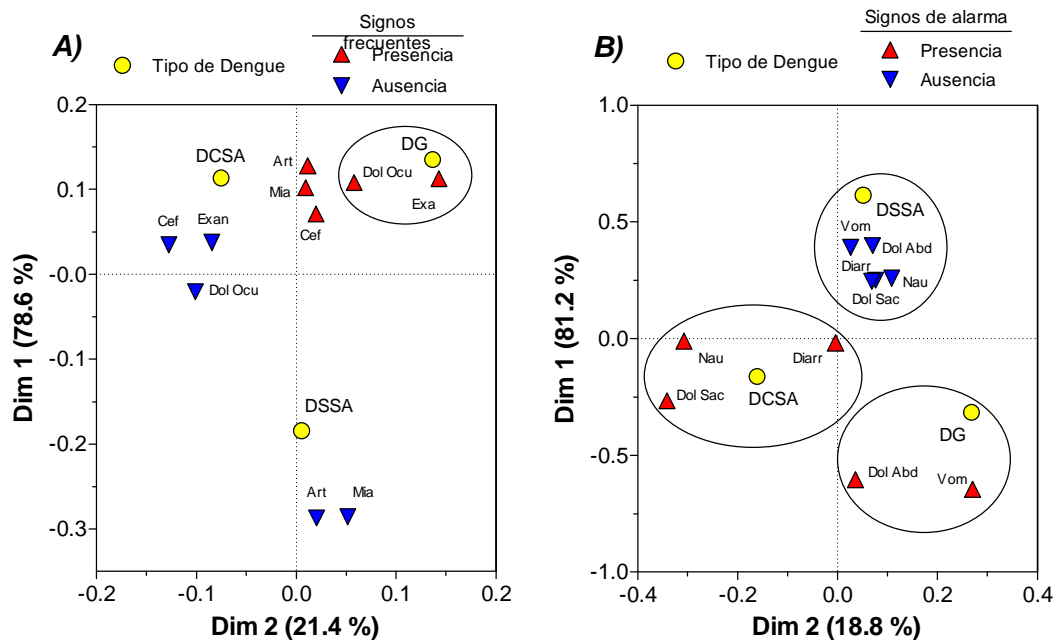


Fig. 9. Análisis de correspondencia. A) Se muestra la correspondencia entre las manifestaciones clínicas más frecuentes y la severidad de la enfermedad. El DG muestra una correspondencia muy marcada con el exantema (Exa) y el dolor retroocular. B) Se muestra la correspondencia entre los signos de alarma y la severidad de enfermedad. El DG muestra una mayor correspondencia con el vómito y el dolor abdominal, mientras que las náuseas, dolor sacrolumbar y la diarrea tienen una mayor correspondencia con el DCSA.

El recuento plaquetario se ha usado como un criterio para la clasificación de la OMS de 1997 para casos de dengue severo. Sin embargo, en la actualidad no constituye un criterio para clasificar un caso como grave (OMS, 2009). La clasificación de la OMS de 2009 para casos de dengue no propone algún valor umbral plaquetario como criterio para discriminar entre DG y D±SA, por lo que en nuestra cohorte decidimos evaluar la sensibilidad y especificidad del recuento plaquetario para detectar casos severos mediante el análisis de la curva de características operador del receptor (ROC). Para ello se determinó diariamente el número de plaquetas durante el seguimiento de los pacientes. Inicialmente se determinó el nadir plaquetario, para observar el comportamiento de la frecuencia relativa acumulada de casos por intervalo plaquetario dentro de los grupos de DG, D+SA y D-SA (Fig. 10). Entre los casos de DG, el 60% disminuyó el recuento plaquetario a ≤ 25000 plaq/ μ L. El 86% tuvo una cuenta plaquetaria de ≤ 50000 plaq/ μ L. El 94% presentó un número de plaquetas ≤ 75000 plaq/ μ L mientras que el 97% de los casos mostró un recuento plaquetario de ≤ 100000 plaq/ μ L. Con respecto a los casos de D+SA, el 25% disminuyó el recuento

plaquetario a ≤ 25000 plaq/ μ L. El 57% tuvo una cuenta de plaquetas de ≤ 50000 plaq/ μ L. El 79% presentó un recuento plaquetario ≤ 75000 plaq/ μ L mientras que el 89% de los casos mostró un recuento plaquetario ≤ 100000 plaq/ μ L. Entre los casos de D-SA, solamente el 2% tuvo un nadir plaquetario entre 26000-50000 plaq/ μ L. El 7% tuvo un recuento plaquetario entre 26000 y 75000 plaq/ μ L. El 18% tuvo un recuento plaquetario entre 2600 y 100000 plaq/ μ L.

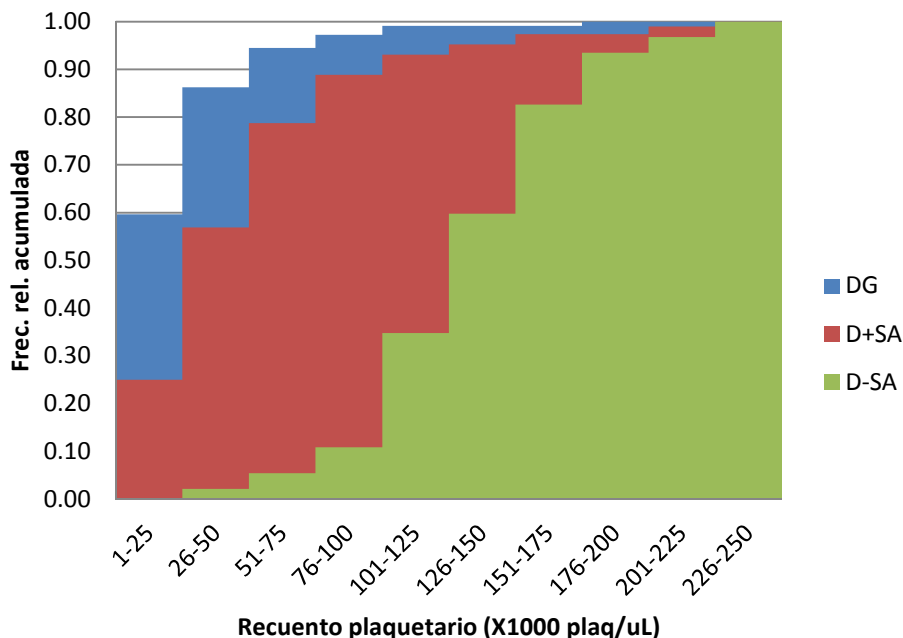


Fig. 10. Distribución de los casos de dengue de acuerdo con la severidad de la enfermedad y el recuento plaquetario. Entre los casos de DG, el 60% disminuyó el recuento plaquetario a ≤ 25000 plaq/ μ L. El 86% tuvo un recuento plaquetario ≤ 50000 plaq/ μ L. El 94% presentó un recuento plaquetario ≤ 75000 plaq/ μ L mientras que el 97% de los casos mostró un recuento plaquetario ≤ 100000 plaq/ μ L. Con respecto a los casos de D+SA, el 25% disminuyó el recuento plaquetario a ≤ 25000 plaq/ μ L. El 57% tuvo un recuento plaquetario ≤ 50000 plaq/ μ L. El 79% presentó un recuento plaquetario ≤ 75000 plaq/ μ L mientras que el 89% de los casos mostró un recuento plaquetario ≤ 100000 plaq/ μ L. Entre los casos de D-SA, solamente el 2% tuvo un nadir plaquetario entre 26000-50000 plaq/ μ L.

Debido a que se observaron diferencias en el comportamiento del recuento plaquetario entre los subgrupos de estudio, se decidió evaluar la sensibilidad y especificidad del recuento plaquetario para detectar casos de dengue grave mediante el análisis de la curva de características operador del receptor (ROC) (Fig. 11). Se seleccionaron diferentes valores umbrales y se estimaron S y E para cada uno de ellos. El valor umbral de 35000 plaq/uL mostró la sensibilidad y especificidad S=75% y E=72.86% más equilibrada. En contraste, un valor umbral de 100,000 plaq/uL (uno de los cuatro criterios necesarios para considerar un caso como FHD), mostró una S elevada (97.25%) pero una E baja (37%). Por lo que el uso independiente del nadir plaquetario para discriminar entre DG y DNG no es eficaz. (N=389, Área bajo la curva COR = 0.8199, IC95%= 0.7767-0.8631), por lo que se propone su utilización junto con otros criterios complementarios. Debido a que la sensibilidad es inversamente proporcional a la especificidad, sería difícil obtener una prueba diagnóstica con un valor umbral que tuviera una sensibilidad y especificidad del 100%.

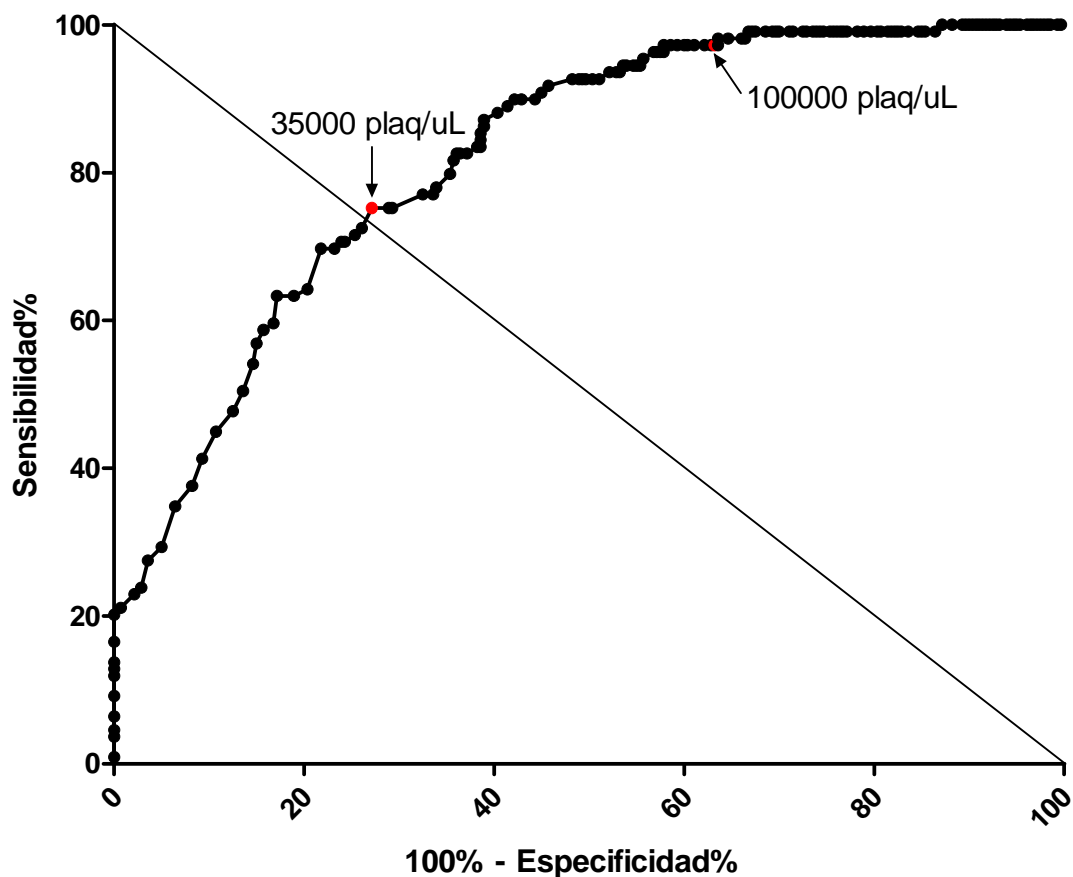


Fig. 11. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del nadir plaquetario. Se seleccionaron varios valores umbrales y se estimaron S y E para cada uno de ellos. En el eje de las abscisas se observa (1-E) y en el eje de las ordenadas se observa S. La prueba ideal (S=1 y E=1) se situaría en el ángulo superior izquierdo de la gráfica. El valor umbral de 35000 plaq/uL mostró la mayor sensibilidad y especificidad S=75% y E=72.86%. Un valor umbral de 100,000 plaq/uL mostró una S de 97.25% y una E de 37%. El uso aislado del nadir plaquetario para discriminar entre DG y DNG no sería muy eficaz. (N=389, Área bajo la curva COR = 0.8199, IC95%= 0.7767-0.8631).

7.1.2 Condiciones coexistentes como factores de riesgo para presentar DG.

Para evaluar el riesgo de progresión en la severidad de la enfermedad, relacionado con la presencia de enfermedades o condiciones coexistentes en nuestra cohorte, se aplicó la prueba exacta de Fisher. Interesantemente, el riesgo de padecer DG se incrementó 4.3 veces en las 13 pacientes embarazadas con respecto a las mujeres de la misma edad que no estuvieran embarazadas (P=0.0155, 95%, CI=1.3-14, prueba exacta de Fisher). La edad

promedio de las embarazadas fue de 25.6±8.6 años; la más joven tenía 15 años, mientras que la mayor tenía 42 años. Las manifestaciones clínicas principales fueron: fiebre, mialgias, artralgias, cefalea y dolor retro-orbital. El vómito se presentó en dos casos. 3 mujeres presentaron epistaxis, una de ellas requirió la atención médica. La principal causa por la que se incrementó el riesgo de DG durante el embarazo fue la extravasación plasmática, mostrando un incremento de 5.356 veces en relación con las mujeres no embarazadas (P=0.0069, 95%, CI=1.639-17.50, prueba exacta de Fisher). El comportamiento del dengue es variable en embarazadas, ya que mientras que una de ellas desarrolló SCHD otra presentó hipertensión. Siete embarazadas mostraron un conteo plaquetario entre 50,000 y 100,000 células/ μ L y una mostró un zenit plaquetario de 101,000 células/ μ L.

Una de las condiciones coexistentes consideradas en la literatura como factor de riesgo para DG es la diabetes. En nuestro estudio identificamos 8 pacientes con diabetes. Sin embargo, el riesgo de presentar DG fue similar entre los diabéticos (un conocido factor de riesgo) y no diabéticos ((P=0.6845, 95%CI=0.2414-6.111), de acuerdo con la prueba exacta de Fisher. Este resultado es diferente al de otros grupos.

7.2 Evaluación de la sensibilidad de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009 para la identificación de Dengue Grave.

Debido a que en la actualidad se utilizan ampliamente ambas clasificaciones (de 1997 y 2009) para la definición de caso de DG, a pesar de los numerosos reportes en referencia a las dificultades para aplicar los criterios de la clasificación de 1997 (Guha-Sapir *et al.*, 2005; Deen J *et al.*, 2006; Rigau-Pérez, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2006), decidimos que era importante evaluar el desempeño de ambas clasificaciones para la detección de casos de DG con el objetivo de usar en nuestro estudio la que tuviera el mejor desempeño. Con base en lo anterior, aplicamos ambos criterios a nuestra cohorte de estudio, obteniendo los siguientes resultados: de acuerdo con la clasificación de la OMS de 1997, se clasificaron 206 (42.1%) casos como FD, 266 (54.4%) casos se clasificaron como FHD y 17 (3.5%) se clasificaron como SCHD. En contraste, con el nuevo sistema de clasificación de la OMS (OMS, 2009), se detectaron 99 casos (20.2%) de dengue severo 390 casos (79.8%) fueron agrupados como dengue no grave, que se clasificaron de la siguiente manera; 177 (36.2%)

casos de dengue sin signos de alarma y 213 casos (43.6%) de dengue con signos de alarma (Fig. 12A). Claramente, la clasificación de 2009 mostró una mayor sensibilidad que la de 1997 para detectar el DG. La clasificación de 2009 no requirió que los casos reunieran estrictamente los 4 criterios para determinar la severidad; por lo tanto, permitió la detección de un mayor número de casos severos.

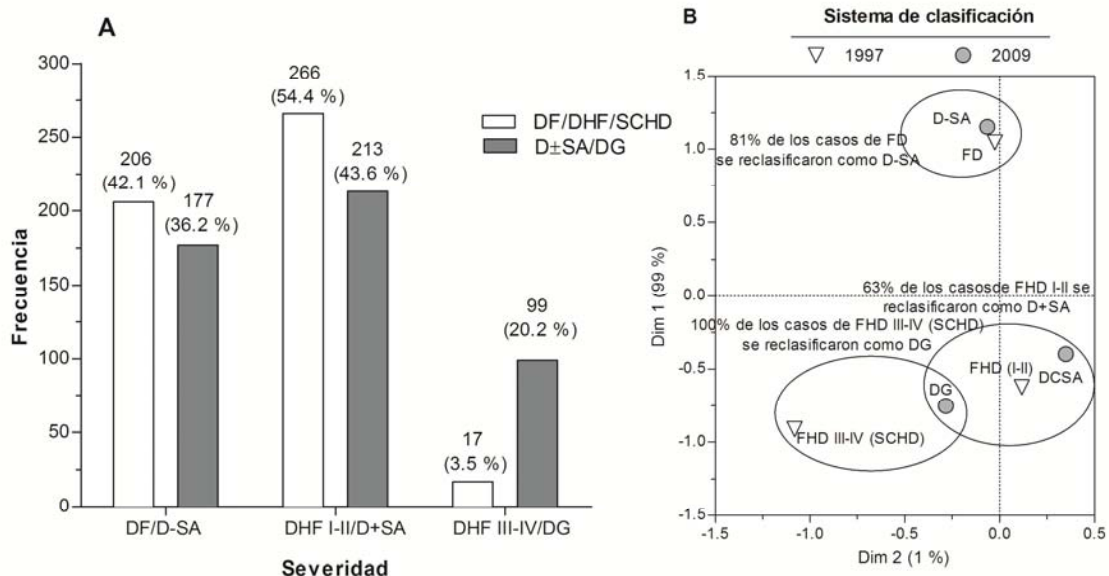


Fig. 12. Correspondencia de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009 para la identificación de Dengue Grave. A) Se muestra el porcentaje de casos de dengue confirmados por laboratorio clasificados como FD, FHD o SCHD de acuerdo con la clasificación de 1997 o clasificados como D-SA, D+SA o DG de acuerdo con los criterios de la clasificación de 2009. B) Se muestra la correspondencia entre las clasificaciones de 1997 y 2009 para la severidad del dengue.

De acuerdo con la clasificación de 1997, el 88.3% (182/206) de los casos fueron tratados como ambulatorios. Sin embargo, el 11.7% (24/206) fueron hospitalizados y requirieron fluidos intravenosos (IV) para rehidratación. Asimismo, el 93.2% (248/266) de los casos de DHF recibieron fluidos IV. Mientras que el 35.3% (6/17) de los casos de DSS fueron tratados de acuerdo al Nivel III de intervención. De esta manera, la sensibilidad para detectar casos severos fue del 75% (CI_{95%} 34.9-96.8) y la especificidad del 97.7% (CI_{95%} 95.9-98.8) (Tabla 4).

De acuerdo con la clasificación de 2009, 90.4% (160/177) de D-WS fueron tratados como ambulatorios, mientras que el 9.6% (17/177) recibieron tratamiento nivel II. El 8.1% (8/99) de los casos de SD recibió tratamiento Nivel III. El hecho de que el total de los 8 casos tratados como Nivel III se hubieran clasificado como SD permitió un elevado nivel de sensibilidad (100% CI_{95%} 63.1-100). Sin embargo, la especificidad fue del 81.1% (CI_{95%} 77.3-84.5) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de la clasificación de 1997 versus el nivel de intervención clínica.

Clasificación de 1997	Nivel de intervención clínica			Total
	Nivel I	Nivel II	Nivel III	
DF	182	24	0	206
DHF	16	248	2	266
DSS	0	11	6	17
Total	198	283	8	489
Sensibilidad 75 (34.9-96.8)		Especificidad 97.7 (95.9-98.9)		

Tabla 6. Comparación de la clasificación de 2009 versus el nivel de intervención clínica.

Clasificación de 2009	Nivel de intervención clínica			Total
	Nivel I	Nivel II	Nivel III	
D-WS	160	17	0	177
D+WS	38	175	0	213
SD	0	91	8	99
Total	198	283	8	489
Sensibilidad 100 (63.1- 100)		Especificidad 81.1 (77.3-84.5)		

La clasificación de 2009 mostró mayor sensibilidad que la de 1997; aunque fue menos específica. La clasificación de 2009 permitió la detección de un mayor número de casos severos, ya que no se requieren estrictamente los 4 criterios de la clasificación de 1997.

Para evaluar la razón costo-beneficio (CBR) y mostrar de manera más clara cuál clasificación mostraba el mejor desempeño, se calculó la CBR en términos de beneficio (la detección de un mayor número de casos de DG para prevenir decesos por dengue), en relación al costo (la sobrecarga de unidades médicas). Interesantemente, nuestros resultados

mostraron que la clasificación revisada produjo un gran beneficio (537%) y un costo limitado (10.2%). En consecuencia, la CBR también fue limitada (0.019).

7.3 Extracción de ARN viral y tipificación del virus infectante mediante RT-PCR de punto final.

Para poder determinar el tipo y cuantificar la carga virales se extrajo el RNA por duplicado a partir de 140 μ l de suero de paciente usando el protocolo QIAamp Viral RNA Kit de Qiagen, el cual es ampliamente utilizado con buenos resultados (Guilarde et al, 2008; Wang et al, 2003; QIAamp Viral RNA Mini Handbook, 2005). El RNA viral se obtuvo en 60 μ L de buffer de elución de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La purificación del RNA viral se llevó a cabo en el 100% de las 216 muestras consideradas como tamaño muestral de la población de estudio (489).

La tipificación del DENV se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Lanciotti (Lanciotti et al, 1992) con las siguientes modificaciones; En el método original se recomienda una concentración de cada dNTP de 200 μ M, sin embargo, al pre-establecer las mejores condiciones, utilizamos 83.3 μ M de dNTPs. En lugar de $MgCl_2$ 1.5 mM, de acuerdo a Lanciotti, nosotros utilizamos una concentración de 1.25 mM obteniendo un rendimiento óptimo en el ensayo de PCR. Con estas condiciones mejoramos la sensibilidad del ensayo. Asimismo, para optimizar la visualización de los productos de amplificación, modificamos las condiciones de la electroforesis en gel. En lugar de hacer la corrida en agarosa al 4%, utilizamos agarosa al 2.2% (debido a que el mayor volumen de muestras a analizar nos exige que usemos una cámara de electroforesis más grande). El gel al 2.2% nos permitió discriminar de manera óptima la banda de 119 pb de DENV-2.

De los eluidos obtenidos en el paso 4.4 se usaron 10 μ L de RNA viral para evaluar el protocolo de RT-PCR de punto final. Utilizamos como controles positivos, diferentes plásmidos que tienen la secuencia y el tamaño esperado de los amplicones: TS1, TS2, TS3 y TS4, los cuales fueron donados gentilmente por la Biól. Lilia Juárez del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas (CISEI). Como control negativo de las reacciones de RT y las dos de PCR se usó H_2O con DEPC en cada experimento.

De las 219 muestras analizadas, el DENV-2 fue el serotipo prevalente en las muestras (99%). Mientras que DENV-1 fue detectado en 2 (1%) casos. Prácticamente el brote epidemiológico fue producido por DENV-2.

7.4 Determinación de la respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria) mediante avidéz de anticuerpos anti-DENV IgG por ELISA.

Para diferenciar entre una respuesta inmune primaria y una secundaria, utilizamos la prueba de avidéz de anticuerpos anti-dengue IgG, en 220 muestras. El análisis de la respuesta de anticuerpos determinó que en el 85.6% (189) de los casos se mostraba una respuesta de anticuerpos secundaria, mientras que 31 casos (14.4%) mostraban una respuesta primaria. Encontramos una tendencia creciente a una respuesta secundaria de anticuerpos conforme se incrementaba la edad: 81.1% en pacientes entre 0-15 años de edad y 100% de pacientes ≥ 27 años. La infección por DENV-2 en individuos que presentan una respuesta secundaria de anticuerpos se asoció con una mayor severidad de la enfermedad (Tabla 6).

Tabla 7. Respuesta de anticuerpos en una infección y gravedad de la enfermedad.

Respuesta de anticuerpos	Dengue grave		Dengue no grave	
	n	%	n	%
Secundaria	75	97.4	114	80.3
Primaria	2	2.6	29	19.7
	77	100%	143	100%

P=0.0001, OR=9.5, prueba exacta de Fisher.

7.5 Cuantificación de carga viral mediante RT-PCR en tiempo real.

Se determinó la carga viral en 216 muestras (100%), número calculado como tamaño muestral mediante qRT-PCR. Para obtener una curva estándar (Figura 13) se hicieron 5 diluciones sucesivas 1:10 de una muestra del virus dengue (cepa D2NGC) titulada mediante ensayo de placa lítica. Las muestras fueron colectadas entre los días 1 y 10 del inicio de los síntomas. Inclusive se pudo detectar carga viral (3.99 log de copias/mL) en un paciente con

DG aún en el 11º día de inicio de síntomas. Asimismo, observamos una carga viral de 3.45 log de copias/mL en un paciente con DG en el día 5 de la defervescencia. El rango de carga viral en el resto de las muestras osciló entre 14 y 10, 000, 000, 000 copias/mL (1.15 y 10.0 log₁₀ copias/mL) de suero.

Figura 13. Gráfica de amplificación y curva estándar.

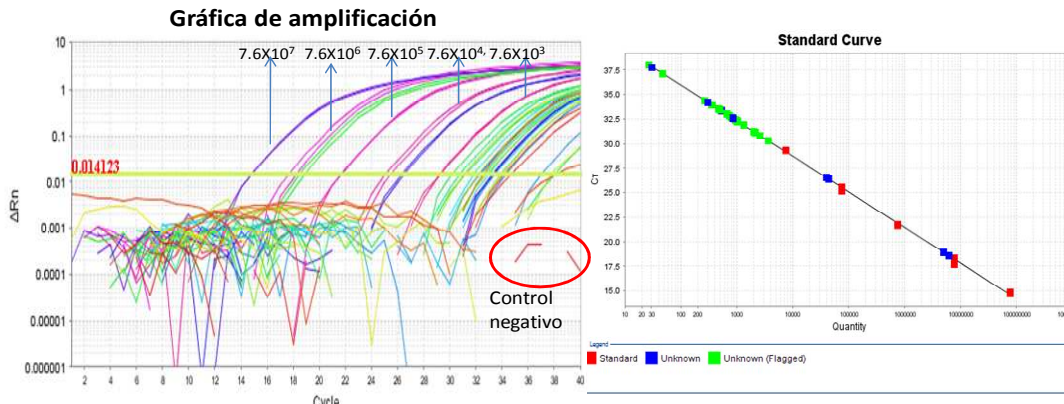


Figura 13a La gráfica de amplificación. En el eje X se muestra el número de ciclo, en el eje Y se muestra la intensidad de la fluorescencia. La línea umbral (0.014123) determina el ciclo umbral de cada curva de amplificación del producto de la PCR. Figura 13b. La curva estándar grafica en el eje de las X, la concentración de las diluciones sucesivas del patrón de concentración conocida contra el ciclo umbral. La concentración desconocida de las muestras se determina extrapolando el ciclo umbral producido en la curva de amplificación.

La diferencia en la distribución de la carga viral en los pacientes con DG y D±SA de acuerdo al día de inicio de síntomas se muestra en la Tabla 7 y Figura 14.

Tabla 8. Distribución de la carga viral en los pacientes con Dengue Grave y Dengue con o sin signos de alarma.

DIS	Carga viral en Dengue con o sin signos de alarma.					
	Carga viral en Dengue Grave			Carga viral en Dengue con o sin signos de alarma.		
	1-4	5-7	8-10	1-4	5-7	8-10
Mínimo	3.99	0	0	0	0	0
Percentil 25	4.73	3.3	3.39	3.85	2.49	0
Media	5.666	3.787	4.431	4.924	3.622	1.354
Mediana	5.2	3.78	4.89	5.22	3.55	0
Percentil 75	6.748	4.69	5.6	5.97	5.13	3.413
Máximo	9.61	10	8.58	9.34	6.79	4.2
N	14	47	15	71	63	10

DIS, día de inicio de síntomas

La carga viral se expresa en log copias/mL

La mediana de los niveles de viremia por día de la enfermedad o por día de la defervescencia para cada categoría de enfermedad se muestra en la Fig. 14: A) En D±SA, los niveles de viremia disminuyeron significativamente de acuerdo con el día de la enfermedad, con una correlación lineal muy fuerte (Pearson $r = -0.9877$, $P < 0.0001$). Esto significa que el día de la enfermedad explica el 97.56% de la tendencia en los niveles de viremia en D±SA. B). En contraste, en DG, los niveles de viremia no disminuyeron significativamente con el día de la enfermedad, mostrando una débil correlación (Pearson $r = -0.5314$, $P = 0.2824$). Además, los cambios cinéticos de la viremia de DG y D±SA mostraron tendencias significativamente diferentes ($P = 0.008254$) de acuerdo al día de la enfermedad (4E). Posteriormente evaluamos los niveles de viremia por etapa (febril, crítica o convalecencia. Véase Métodos). En DIS 1-4, la viremia en SD fue mayor que la viremia en D±WS. Interesantemente, durante DIS 5-10 la viremia permaneció elevada en DG; en contraste, la viremia disminuyó significativamente en D±SA ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis Test, Dunn's Multiple Comparison Test) (Figura 15).

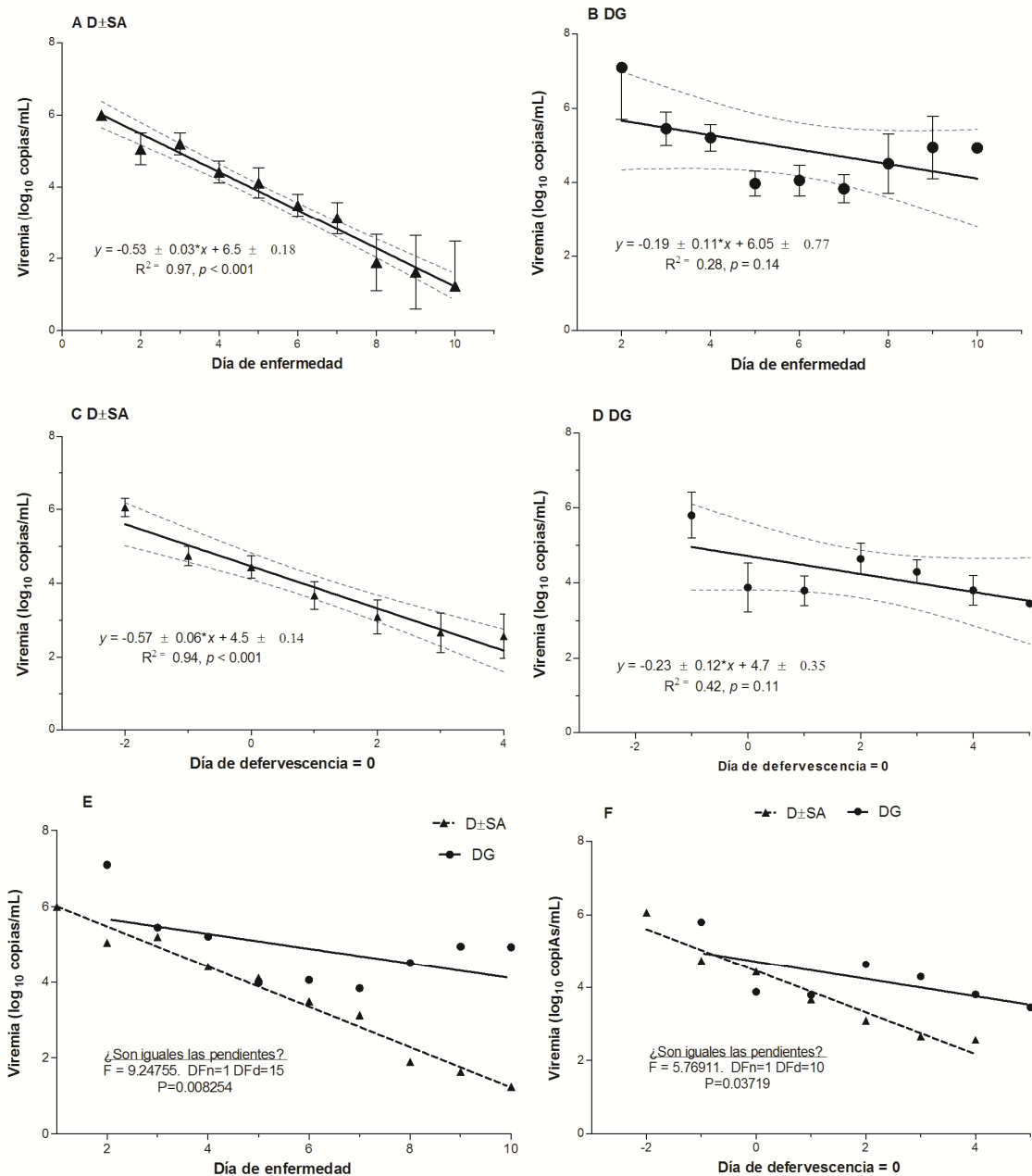


Fig. 14. Niveles de viremia en pacientes con dengue. La viremia en muestras séricas se determinó mediante RT-PCR de un solo paso. Los triángulos y círculos oscuros muestran la mediana de los niveles de viremia por día de la enfermedad o por día de la defervescencia para cada categoría de enfermedad. A y B) Dengue con o sin signos de alarma y dengue grave por día de enfermedad. C y D) Dengue con o sin signos de alarma y dengue grave por día de defervescencia. E) los cambios cinéticos de la viremia de DG y D±SA mostraron tendencias significativamente diferentes ($P=0.008254$) de acuerdo al día de la enfermedad. F) los cambios cinéticos de la viremia de DG y D±SA mostraron tendencias significativamente diferentes ($P=0.008254$) de acuerdo al día de defervescencia.

Para evaluar el papel de la defervescencia en la patogénesis del dengue, la viremia se analizó de acuerdo al día de defervescencia. En D±SA, la viremia disminuyó significativamente de acuerdo con el día de la defervescencia, con una correlación lineal muy fuerte (Fig. 3C) ($r = -0.9711$, $P = 0.0003$). La bondad del ajuste muestra que el día de la defervescencia explica 94.31% de la tendencia en los niveles de viremia en D±SA. En contraste, en DG, los niveles de viremia no disminuyeron significativamente con el día de la defervescencia, mostrando una débil correlación ($r = -0.6541$, $P = 0.1110$) (Fig. 14D). Asimismo, las pendientes de la viremia en DG y D±SA mostraron tendencias significativamente diferentes de acuerdo con la defervescencia ($P = 0.03719$) (14F).

Durante la etapa febril, la viremia en DG fue más alta que en D±SA. Durante la defervescencia no hubieron diferencias significativas entre la viremia en DG y D±SA. Interesantemente, después de la defervescencia, la viremia en DG permaneció elevada; en contraste, la viremia en D±SA disminuyó significativamente (Prueba de Kruskal-Wallis, post-prueba de comparación múltiple de Dunn, $P = 0.0001$) (Figura 16).

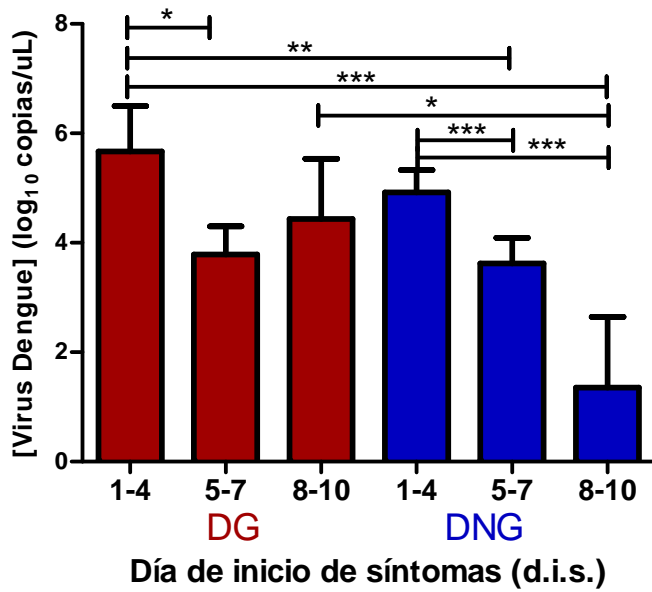


Fig. 15. Magnitud de la viremia por día de inicio de síntomas y severidad de la enfermedad. Concentración viral en suero de 219 pacientes con DG y DNG del día 1 al 10 del inicio de síntomas. Durante los primeros 4 días, la concentración en DG es mayor que en DNG. Entre los días 7-10 del inicio de síntomas, la concentración permanece elevada en DG, mientras que en DNG la concentración disminuye significativamente (Prueba de Kruskal-Wallis, postprueba de comparación múltiple de Dunn, $P < 0.0001$).

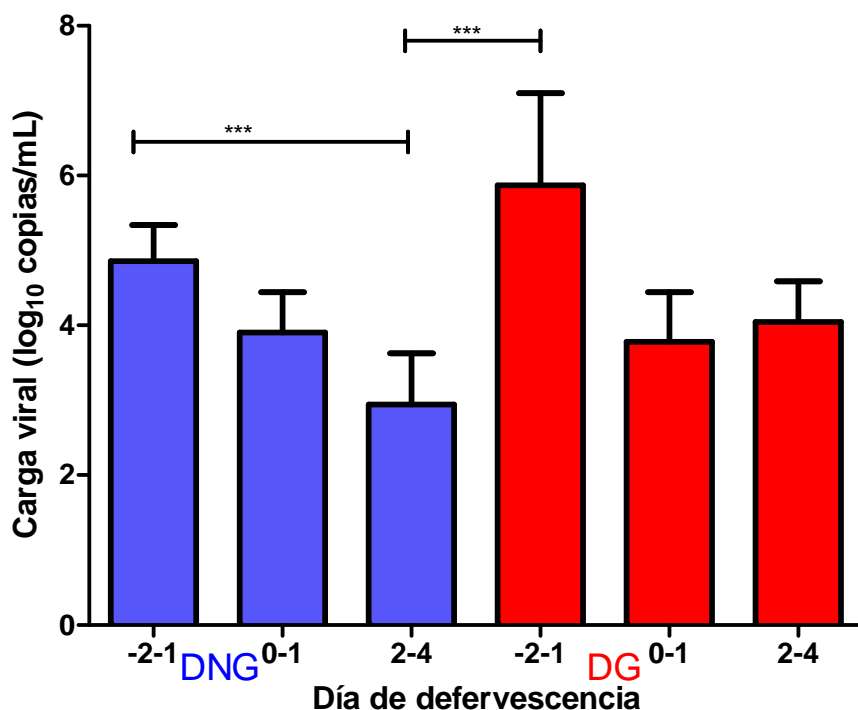


Fig. 16. Magnitud de la viremia por día de defervescencia por severidad de la enfermedad. En el periodo febril, la carga viral es mayor en los pacientes con DG que en los pacientes con DNG. Durante la defervescencia aun puede observarse la presencia de la carga viral, tanto en pacientes con DG como en pacientes con DNG. Durante los días 2 a 4 de la defervescencia la carga viral permanece elevada en los pacientes con DG, en contraste, la carga viral disminuye significativamente en DNG (Prueba de Kruskal-Wallis, postprueba de comparación múltiple de Dunn, P=0.0001)

Los resultados de la regresión logística muestran cuatro posibles factores de riesgo asociados con una mayor probabilidad para detectar SD de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2009 (Tabla 5). El modelo sugiere que tanto la carga viral como la fase de la enfermedad son variables predictoras importantes, lo anterior en concordancia con los cambios en la viremia que se observaron durante las fases de la enfermedad, los cuales, además, resultaron diferentes entre ambos grupos. Es por ello que cuando se observó un paciente con un nivel de viremia alto $> 3.5 \text{ Log}_{10} \text{ copias} / \mu\text{L}$ (OR=3.36, 95%CI=1.58-7.11) durante la etapa Toxica o de Defervescencia (OR=7.11, 95%CI=2.41-20.9), se demostró un riesgo mayor de presentar SD. De forma similar, el recuento plaquetario con niveles $<$

35,000/ μ L se consideró una variable predictora valiosa para diferenciar la gravedad de la enfermedad. Lo anterior debido a que los pacientes con SD se asociaron a un riesgo 2.84 mayor de presentar niveles tan bajos de plaquetas (Tabla 6). El tipo de infección también contribuyó significativamente en el modelo para definir el riesgo de presentar SD. Específicamente se encontró que los pacientes que presentaron una infección secundaria por DENV-2, se asociaron a un mayor riesgo de presentar SD con respecto a un paciente con infección primaria (OR=5.67, 95%CI=1.22-26.22). Debido a que se utilizó una regresión con cuatro variables predictoras, es importante que éstas se consideren en conjunto para aumentar la eficacia y robustez durante el pronóstico de la gravedad de la infección por DENV.

Adicionalmente se construyó un modelo de regresión logística para pronosticar SD, a partir del mismo conjunto de variables predictoras utilizadas previamente, de acuerdo con la clasificación de 1997 (Tabla 7). En contraste a los resultados encontrados con la clasificación de 2009, a pesar de que el modelo sugiere que las variables fase de la enfermedad, tipo de infección y recuento plaquetario presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$), no se encontró algún factor de riesgo (Tabla 7) para discriminar entre un paciente con FD y/o FHD (I-II) vs FHD (III-IV). Lo anterior se puede asociar a la baja frecuencia (n=17) de pacientes en el grado más alto de gravedad (FHD grado III-IV) dentro de dicha clasificación. Además, este resultado es importante porque corrobora la mayor sensibilidad de la clasificación de 2009 para detectar SD.

8. DISCUSION

El dengue es una enfermedad compleja, en la que un espectro de enfermedad existe en lugar de dos entidades distintas (FD o FHD/SCHD).

Caracterización epidemiológica de la cohorte de estudio

La cohorte del presente estudio se conformó por 489 pacientes, con diagnóstico de dengue, confirmados por laboratorio, evaluamos las características clínico-epidemiológicas del grupo de estudio en un brote de dengue ocurrido en el Centro de Chiapas. Encontramos que

el 31.0% de nuestra población tiene 15 años o menos de edad. Este dato muestra que el DENV puede afectar tanto a niños como a adultos. Nuestros resultados concuerdan con datos reportados en Brasil en donde se presenta una proporción similar (26.6%) de infección en niños (Cordeiro *et al*, 2007). En contraste, en los países de Asia Sudoriental, en los cuales el dengue es endémico, los niños son afectados con mayor frecuencia (Graham *et al*, 1999). Aunque en Vietnam la mayoría de los pacientes son niños, la proporción de adultos con dengue se ha estado incrementando constantemente (Anders *et al*, 2011). En años recientes la infección por dengue en Singapur (Ooi *et al*, 2006; Ong *et al*, 2007; Leo *et al*, 2011) y en Tailandia (Cummings *et al*, 2009) han evolucionado de una enfermedad principalmente infantil a una que se presenta en adultos. Sin embargo, el DG afecta principalmente a la población entre 9-16 años (Tabla 3), lo cual es consistente con reportes previos en Yucatán y Oaxaca, México (Loroño-Pino *et al*, 2004; Günther *et al*, 2009). En contraste, la edad promedio en los casos de FHD en Sinaloa fue de $35,3 \pm 14,2$ años (Ramírez-Zepeda *et al.*, 2009). Por otra parte, en la epidemia de Tainan, Taiwán, donde el dengue no es endémico, el rango de edad de los pacientes con FHD fluctuó entre 13 y 73 años, con una media de 42 (Chao *et al.*, 2004). Estos resultados muestran que en regiones endémicas, la mayoría de los casos son niños, porque los adultos ya están inmunizados; mientras que en regiones con reciente introducción del virus o con pocas epidemias, se afectan más adultos porque no se habían expuesto en la infancia o se expusieron pocas veces al virus. Ahora bien, el reciente incremento de la proporción de adultos afectados en países endémicos podría deberse a la introducción de nuevos genotipos. Probablemente, la frecuencia de FHD en niños en regiones endémicas sea el resultado de la inmunidad a la infección en adultos, y no a una mayor susceptibilidad en niños.

En el presente estudio no observamos diferencias significativas en referencia a propensión de género ($P=0.5222$). Al igual que en nuestro estudio, en Nicaragua, la enfermedad severa se distribuyó uniformemente entre los géneros masculino y femenino (Narváez *et al.*, 2011). Sin embargo, los reportes sobre el papel que el género desempeña en la severidad de la enfermedad no han sido concluyentes. Algunos estudios en México muestran que la incidencia de FHD es más alta en varones que en mujeres (Günther *et al.*, 2009, Ramírez-Zepeda *et al.*, 2009). En contraste, en el contexto internacional, estudios epidemiológicos

en Brasil muestran una incidencia total del dengue más elevada en mujeres (Nunes-Araújo *et al.*, 2003; Cordeiro *et al.*, 2007) y de niñas en Vietnam (Anders *et al.*, 2011). La heterogeneidad de los resultados en diferentes regiones sugiere que el riesgo de presentar DG asociado a género apunta más a factores culturales y conductuales que a factores biológicos. La diferente exposición entre el género masculino y el femenino es una posible causa de esta distribución heterogénea. Asimismo, se han asociado algunas causas biológicas entre géneros. Por ejemplo: Una respuesta inmune celular más robusta o una mayor susceptibilidad intrínseca a la permeabilidad capilar en mujeres que en hombres (WHO, 2009).

Otro factor que evaluamos en nuestro estudio, fue el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y el inicio de la atención médica en la población estudiada, siendo más retardado en los casos de D+SA (media=3.857 días) y DG (media=3.917 días) que en los casos de D-SA (media=2.774 días). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los intervalos entre D+SA y los casos de DG. Nuestros resultados concuerdan con los reportados en Sinaloa, México (Ramírez-Zepeda *et al.*, 2008) y en Martinica (Thomas *et al.*, 2008). Estos datos podrían sugerir que el retraso en el inicio de la atención médica podría influir en la evolución de la enfermedad. La incorporación de los pacientes en nuestro estudio en el estado avanzado en la enfermedad, constituye una limitante porque obstaculiza la identificación temprana de factores de riesgo para las formas severas de la enfermedad.

Debido a que la trombocitopenia se ha considerado como un factor patognomónico del dengue, el recuento plaquetario se ha usado como un criterio (clasificación de la OMS de 1997) para la clasificación de los casos de DG. La mayor parte de los pacientes involucrados en el presente estudio, mostraron trombocitopenia. Sin embargo, en la actualidad, éste parámetro no constituye un criterio para clasificar un caso como grave, ya que en la clasificación de la OMS de 2009 no se recomienda algún valor umbral plaquetario como criterio para discriminar entre DG y D±SA. Por esta razón decidimos evaluar la sensibilidad y especificidad del recuento plaquetario para detectar casos severos mediante el análisis de la curva de características operador del receptor (COR). Observamos que el valor umbral de 35000 plaq/ μ L mostró una sensibilidad y una especificidad de 75% y 72.86% equilibradas. En contraste, un valor umbral de 100,000 plaq/uL, uno de los cuatro

criterios necesarios para considerar un caso como FHD (WHO, 1997), mostró una S elevada (97.25%) pero una E baja (37%). Aunque constituye una de las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes con dengue, la trombocitopenia no ha mostrado ser un buen predictor de FHD (Lum *et al.*, 2002; Lum *et al.*, 2003). Estos datos en conjunto pueden sugerir que una trombocitopenia ≤ 35000 plaq/uL pudiera utilizarse para detectar casos graves, pero no para predecir la aparición de hemorragia.

Se ha propuesto que la trombocitopenia puede asociarse ya sea con alteraciones en la megacariopoyesis debida a la infección por DENV de células hematopoyéticas o con disfunción plaquetaria (activación y agregación plaquetaria), destrucción o consumo incrementado de las mismas (secuestro periférico y consumo) (WHO, 2009). Sin embargo, los mecanismos precisos que producen trombocitopenia en el contexto de la infección por DENV es aún controversial, debido a la falta de evidencia *in vivo* (Noisakran *et al.*, 2012). Diferentes mecanismos podrían estar participando en la trombocitopenia presente en pacientes con dengue: la destrucción de plaquetas producidas por la lisis mediada por complemento, fagocitosis por macrófagos o células dendríticas mediada por IgG-Fc γ II (Nardi *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2009) y la agregación plaquetaria a las células endoteliales (Butthep *et al.*, 1993). Estudios recientes muestran que la agregación plaquetaria a células monocíticas es uno de los eventos más significativos durante la defervescencia (Tsai *et al.*, 2012). Asimismo, se ha observado un incremento en la fagocitosis de plaquetas apoptóticas en el contexto de la infección secundaria por DENV (Alonzo *et al.*, 2012). Se ha asociado la participación de la formación de complejos inmunes circulantes en la disminución de plaquetas en la circulación (Saito *et al.*, 2004). Asimismo, se ha observado la presencia de partículas similares a DENV en plaquetas de pacientes con dengue (Noisakran *et al.*, 2009) e inmunoglobulinas asociadas a plaquetas (PAIgM/PAIgG) que podrían reaccionar con el antígeno viral expresado en la superficie de plaquetas (Honda *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que el DENV podría unirse directamente a las plaquetas y que las PAIgM/PAIgG podrían reaccionar con el antígeno viral expresado en la superficie de las plaquetas (Noisakran *et al.*, 2012). Recientemente, en un estudio se mostró la presencia de células que expresaban integrina CD61+. Estos hallazgos sugieren que las células CD61+ que contienen partículas virales podrían estar asociadas a la disfunción plaquetaria y a la trombocitopenia presente en pacientes con dengue (Noisakran *et al.*, 2012).

Condiciones coexistentes como factores de riesgo para DG

Entre las características clínicas y epidemiológicas que pudieran representar un factor coexistente de riesgo individual para la presentación de DG, observamos además de la diabetes, el embarazo. La presentación de dengue grave durante el embarazo, se asocia principalmente con muerte materna, partos pretérmino y hemorragias durante el embarazo o durante la labor de parto (Basurko *et al.*, 2009; Adam *et al.*, 2010).

De manera interesante, se detectaron 13 mujeres embarazadas en nuestro estudio. De manera similar a nuestros hallazgos, se han reportado casos, series de casos (Poli *et al.*, 1991; Rosado-Leon *et al.*, 2007) y estudios retrospectivos en 53 (Basurko *et al.*, 2009), 78 (Adam *et al.*, 2010) y 14 (Chitra and Panicker, 2011) embarazadas infectadas por DENV alrededor del mundo. Nuestro estudio mostró por primera vez que las mujeres embarazadas tenían 4.3 veces más probabilidades de cursar DG que las mujeres sin esta condición coexistente. El riesgo incrementado (5.356 veces) de desarrollo de extravasación plasmática (P=0.0069, 95%, CI=1.639-17.50, prueba exacta de Fisher) puede explicar este hallazgo. Estos hallazgos no se habían reportado antes. Una mujer desarrolló SCHD, en contraste, otra desarrolló hipertensión con una duración de 24 horas, confirmando la observación de Chitra y Panicker en el sentido de que las mujeres embarazadas pueden desarrollar hipertensión (2011). La mayoría de los signos y síntomas fueron similares tanto en mujeres embarazadas como en mujeres no embarazadas de la misma edad. Se observó vómito en 2/13 casos. Además, 3/13 embarazadas presentaron epistaxis, una de las cuales requirió la atención médica. El 53% de las embarazadas mostró un nadir plaquetario $\leq 50,000$ plaquetas/ μL , lo que representa una trombocitopenia severa entre las embarazadas. No hubo muertes maternas en nuestro estudio, de manera similar al reporte de Chitra & Panicker (2011). En contraste, hubieron 17 (21.7%) de muertes maternas debido a la infección por DENV en Sudan (Adam *et al.*, 2010), en donde la mortalidad materna elevada (4.9% y 25%) se ha asociado con diversas enfermedades infecciosas (Haggaz *et al.*, 2007; Elhassan *et al.*, 2009). Debido a que la presentación del dengue en embarazadas es relativamente reciente y a la escasez de estudios al respecto, no se conocen los posibles mecanismos que participan en su patogénesis (Tan *et al.*, 2012).

La diabetes, otra condición coexistente que aumenta el riesgo de DG, se presentó en 8 pacientes. Sin embargo, en nuestra cohorte, el riesgo de presentar DG fue similar entre los diabéticos y los no diabéticos ($P=0.6845$, $95\%CI=0.2414-6.111$, prueba exacta de Fisher). El bajo número de pacientes diabéticos limita la interpretación de nuestros resultados. Este dato es contrario a los existentes en la literatura (Bravo *et al.*, 1987; Lahiri *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2010). No se conocen con exactitud los mecanismos que participan en la progresión del dengue en diabéticos. Estudios previos han mostrado disfunción endotelial y producción incrementada de citocinas en pacientes diabéticos (Makino *et al.*, 2005; Cipolletta *et al.*, 2005). Adicionalmente se han reportado niveles elevados de la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1) (Cipolletta *et al.*, 2005) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Brausewetter *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que las citocinas presentes en el plasma de diabéticos podrían predisponerlos tanto a la extravasación plasmática como al dengue grave durante la infección por DENV. En un estudio ex-vivo se observó una sobreproducción de citocinas proinflamatorias y daño al endotelio vascular que podría explicar una extravasación plasmática y, en consecuencia la enfermedad grave y letal. Además, se observó la presencia de apoptosis en células endoteliales microvasculares intestinales (Limonta *et al.*, 2008). Se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos que agravan el dengue en diabéticos.

Evaluación de la sensibilidad de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009 para la detección de DG.

Evaluamos el desempeño de las clasificaciones de 1997 y 2009 de la OMS para identificar los casos de dengue severo, ya que tanto la clasificación 1997 como la clasificación de 2009 se utilizan de manera indistinta (WHO, 2009; Barniol *et al.*, 2011; Narváez *et al.*, 2011), pero existe controversia para el uso de la clasificación revisada. En nuestro país, la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector aun funciona de acuerdo con los criterios de la clasificación de 1997. En México no existen estudios que muestren la eficacia de ambas clasificaciones para la detección de los casos severos del dengue, estudios que son importantes y necesarios para contar con evidencias que orienten a los servicios de salud en la toma de decisiones certeras.

Nuestros resultados mostraron que la clasificación de la OMS de 2009 tuvo mayor sensibilidad que la de 1997 para detectar los casos de DG. El dengue grave, de acuerdo con la clasificación publicada por la OMS en 2009, constituyó el 22.3% de los casos. En la actualidad, pocos estudios se han enfocado en la comparación entre las clasificaciones de 1997 y 2009. En un estudio prospectivo en 145 pacientes pediátricos de un hospital en Indonesia se clasificó como DG al 19.3% de los casos (Basuki *et al.*, 2010). En otro estudio realizado en Nicaragua, se clasificó como DG al 44.5% de 544 pacientes pediátricos hospitalizados (Narváez *et al.*, 2011). Nuestros datos son similares a los observados en estos reportes.

Existen pocos estudios en los que se hace una comparación de las clasificaciones de la OMS de 1997 y 2009. La mayoría concuerda en que la clasificación de 2009 tiene mayor sensibilidad, o que resulta útil para categorizar casos que no reúnen los requisitos para FHD de la clasificación de 1997, por ejemplo, dengue con manifestaciones inusuales (Basuki *et al.*, 2010, Barniol *et al.*, 2011; Narváez *et al.*, 2011). Asimismo, en un estudio retrospectivo en 28 casos letales en adultos en Singapur, se observó que solamente el 35.7% de los casos cumplía los criterios de la OMS de 1997 para FHD; sin embargo, el 100% de los casos fue clasificado como DG por el sistema de 2009 (Leo *et al.*, 2011). En contraste, Van de Weg y colaboradores, señalan menor sensibilidad de la clasificación de 2009, pero mayor especificidad que la de 1997, basado en un estudio en niños en Indonesia (2012).

La clasificación de la OMS de 1997 estaba basada en la experiencia clínica con una población pediátrica en Asia Sudoriental. En la actualidad, la presentación clínica de la enfermedad ha cambiado, puesto que el dengue se ha extendido a otras regiones tropicales y subtropicales. El dengue presenta un amplio espectro clínico y, por lo tanto, la clasificación de la severidad depende de la presencia de manifestaciones clínicas específicas. La clasificación de 1997 requiere estrictamente que se presenten 4 criterios para calificar un caso como FHD, pero se han observado casos que no reúnen los 4 criterios, dificultando la clasificación y detección de casos severos. Entre los obstáculos para la clasificación, está la intervención terapéutica como la administración de fluidos durante el curso de la enfermedad, ya que puede modificar el hematocrito, y por lo tanto, la hemoconcentración (Guzmán *et al.*, 1987). El uso de valores de referencia basados en la

población es útil para evaluar prospectivamente el hematocrito, debido a que los pacientes pueden solicitar tardíamente los servicios de salud, por lo tanto pueden tener un incremento en el hematocrito que puede dificultar la evaluación de la hemoconcentración. El uso de un hematocrito convaleciente requiere una clasificación retrospectiva de los casos de dengue.

La diferencia en la proporción de los casos graves entre ambos sistemas de clasificación puede explicarse por la existencia de 89 pacientes que no mostraban hipotensión pero mostraron hemoconcentración o hemorragia severa. Además, 10 pacientes con un recuento plaquetario $\leq 10,000$ plaq/ μ L, 2 pacientes con hemorragia severa y uno con hemoconcentración no llenaron los criterios de la clasificación de 1997 y se clasificaron como FD. De acuerdo al sistema de 1997 de la OMS, 283 casos clasificados como FHD/SCHD requirieron hospitalización para vigilarse estrechamente. En contraste, mediante la clasificación de 2009, 312 casos clasificados como D+WS/SD requirieron hospitalización para una vigilancia estrecha. Por lo tanto, sólo hay un incremento de 10.2% (Graham *et al.*, 1999) en la hospitalización de pacientes. Estos 29 casos, de manejarse como ambulatorios podrían exponerse al riesgo de enfermedad severa. La clasificación de 1997 requiere de la estricta presentación de 4 criterios para clasificar un caso como FHD, pero se han observado casos que no reúnen los 4 criterios, lo cual dificulta la clasificación y detección de casos severos. En contraste, la clasificación de 2009 no requiere la presentación estricta de los 4 criterios para determinar la severidad; por lo tanto, permite definir mejor los casos graves. Esta flexibilidad permitiría evitar los casos letales por dengue, aunque podría incrementar ligeramente la hospitalización de pacientes.

Por otra parte, la clasificación de 1997 fue más específica que la de 2009 (97.7 vs. 81.1%). Una posible explicación de la menor especificidad de la clasificación de 2009 sería que 91 pacientes de SD recibieron tratamiento Nivel II. Por otra parte, la alta especificidad de la clasificación de 1997 podría explicarse porque los casos estudiados fueron producidos por DENV-2, serotipo que se ha asociado con FHD/SCHD pero no con DG (Narváez *et al.*, 2011).

Estudios recientes en diferentes países concuerdan en que la clasificación de 2009 detecta mejor los casos severos que la de 1997 [Basuki *et al.*, 2010; Barniol *et al.*, 2011; Narváez *et al.*, 2011 y Alexander *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos investigadores objetan que la

mayor detección de casos severos implica un incremento en la hospitalización de pacientes (Narváez *et al.*, 2011, Kalayanaroj *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que el incremento en la hospitalización de pacientes es pequeño, por lo que el beneficio supera al costo. La desventaja de la clasificación de 2009 con respecto a la de 1997 que consideramos importante es que permite la evaluación arbitraria de la hemorragia intensa por el médico. La hemorragia severa debería ser definida en términos de hematocrito o hemoglobina para poder evaluarla universalmente.

El incremento en la sensibilidad de la clasificación de 2009 para identificar DG, teóricamente, implica un incremento en la admisión a hospitales, reduciendo la capacidad de los servicios de salud. Interesantemente, encontramos que las admisiones sólo aumentaron ligeramente y que los beneficios superaron a los costos. La evaluación de la CBR de ambas clasificaciones en términos de beneficio (la captura de un mayor número de casos graves para prevenir la letalidad producida por dengue) en relación al costo (sobresaturación de unidades de salud), mostró que la clasificación de 2009 presenta un mayor beneficio (537%) y un costo limitado (10.2%) en relación a la clasificación de 1997. En consecuencia, la CBR también fue limitada (0.019). Con base en estos resultados, se recomienda la aplicación de la clasificación de la OMS de 2009. Debido a que no existen antecedentes sobre CBR, se calculó la CBR a partir de los resultados de Kalayanaroj en Tailandia (2011). En este análisis se muestran las siguientes observaciones: el beneficio en nuestro estudio (537%) fue mayor al beneficio calculado con el estudio de Kalayanaroj (32.5%). En contraste, el costo fue menor en nuestro estudio (10.2%) que en Tailandia (101%). En consecuencia, la CBR en nuestro estudio (0.019) fue menor que en Tailandia (3.1). Estas diferencias pueden explicarse por las diferencias en las respectivas poblaciones de estudio. Nuestra población de estudio incluye tanto a niños como a adultos. En contraste, las poblaciones de estudio en el reporte de Kalayanaroj se incluyen únicamente niños. Además, se requieren otros estudios para evaluar el papel de los servicios primarios de salud para el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de los casos de dengue para prevenir la sobresaturación de los hospitales.

Sin embargo, debido al amplio espectro clínico del dengue, será difícil establecer una clasificación que sea sensible y específica al mismo tiempo. Entonces ¿Qué clasificación

debe establecerse? ¿Qué riesgos enfrentarían los servicios de salud? Los resultados indican que se recomendaría adoptar la clasificación de 2009 mientras se continúan haciendo estudios para mejorar la clasificación.

El diagnóstico temprano y tratamiento oportuno del DG podría ayudar a los servicios primarios de salud a evitar la saturación de hospitales.

Tipificación del virus infectante

Como se mencionó en la introducción, cualquiera de los 4 serotipos puede causar dengue grave (Guzmán *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 1999). En este estudio DENV-2 fue el serotipo prevalente. Los tipos virales detectados, DENV-2 (99%) y DENV-1 (1%) concuerdan con los resultados de la vigilancia epidemiológica correspondientes a 2009 que realiza la Secretaría de Salud (<http://www.cenavece.salud.gob.mx/>). Numerosos estudios han mostrado al DENV-2 como uno de los principales serotipos asociados a enfermedad severa (Sangkawibha *et al.*, 1984; Thein *et al.*, 1997; Guzmán *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2011; Duyen *et al.*, 2011; Tricou *et al.*, 2011). Debido a que las infecciones sintomáticas por DENV-2 generalmente se han presentado en infecciones secundarias, discutiremos el serotipo junto con la respuesta secundaria de anticuerpos.

Determinación de la respuesta de anticuerpos (primaria o secundaria)

La evaluación de la respuesta de anticuerpos mostró una fuerte asociación entre la respuesta secundaria y la severidad de la enfermedad producida por DENV-2. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos llevados a cabo en diferentes brotes, entre otros, en Cuba (Guzmán *et al.*, 2002), Rayong, Tailandia (Sangkawibha *et al.*, 1984), Birmania (Thein *et al.*, 1997) y Vietnam (Fox *et al.*, 2011; Duyen *et al.*, 2011; Tricou *et al.*, 2011). En contraste, también se han documentado brotes en los que no se asocia la infección secundaria con la enfermedad severa, por ejemplo los brotes ocurridos en Nicaragua (Harris *et al.*, 2000), Taiwán (Chao *et al.*, 2004) y en Brasil (Guilarde *et al.*, 2008). La razón para este comportamiento epidemiológico puede ser que en estos brotes el serotipo prevalente fue DENV-3; lo que sugiere que DENV-3 puede producir una infección primaria

sintomática. Además, no se encontró una fuerte asociación de la infección secundaria por DENV-2 con la severidad de la enfermedad como se hubiera esperado durante los brotes ocurridos en Yogyakarta, Indonesia (Graham *et al.*, 1999) e Iquitos, Perú (Watts *et al.*, 1999). Una posible razón para este patrón es que los virus del DENV-2 genotipo americano, se replican de manera moderada, favoreciendo una menor viremia in vivo, con presencia de una enfermedad leve aun en presencia de anticuerpos amplificadores de la infección (Leitmeyer *et al.*, 1999). En el presente estudio, solamente 2/31 infecciones primarias por DENV-2 causaron una enfermedad severa. Además, 2/77 casos de DG fueron producidos por infección primaria por DENV-2. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios (Guzmán *et al.*, 2000, Fox *et al.*, 2011) en los que se ha visto que las infecciones primarias por DENV-2 raramente son sintomáticas y más raramente producen una enfermedad severa.

Cuantificación de los niveles de carga viral

Se lograron determinar los niveles de carga viral de las muestras de pacientes con DG y D±SA entre los días 1 y 10 de la enfermedad. El rango de carga viral que se ha podido cuantificar oscila entre 14 y 10, 000, 000, 000 copias/mL (1.15 y 10.0 log₁₀ copias/mL) de suero. Estos resultados son consistentes con los de otros grupos (Wang *et al.*, 2003; Guilarde *et al.*, 2008 y Gurukumar *et al.*, 2009).

Los niveles de carga viral son variables y cambian con el tiempo. De manera interesante, observamos que en los pacientes con dengue grave, la carga viral permanece elevada ya sea por día de inicio de la enfermedad o en relación a la defervescencia. En contraste, la carga viral disminuyó en los pacientes con dengue no grave en cualquiera de los dos marcos de referencia. Estos datos muestran la posible participación de factores virales en el curso posterior de la infección, ya sea que se resuelva o que curse como una enfermedad severa (Wang *et al.*, 2003; Guilarde *et al.*, 2008; Tricou *et al.*, 2011).

Nuestros resultados concuerdan con algunos estudios que sugieren una asociación entre la viremia y la severidad de la enfermedad. (Vaughn *et al.*, 2000; Duyen *et al.*, 2011; Tricou *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2008); otros muestran lo contrario (Yeh *et al.*, 2006; Duong *et*

al.; 2011). Recientemente, un estudio mostró niveles iniciales de viremia menores en pacientes con FHD que con FD (De la Cruz Hernández *et al.*, 2013a).

Una viremia elevada y prolongada necesitaría una respuesta inmune más robusta para ser clarificada; la cual, podría producir alteraciones a nivel del endotelio vascular, en los sistemas de coagulación-inflamación y daño de órganos. Con base en observaciones de otros estudios, los datos mostrados en el presente estudio, podrían tener diferentes explicaciones, entre otras: la capacidad de evasión de la respuesta inmune por algunos aislados virales; incremento en la capacidad de replicación de algunos virus e incapacidad del huésped para aclarar la viremia. Varios estudios clínicos han mostrado diferencias cuantitativas entre los distintos serotipos del DENV con respecto a los niveles de la viremia (Tricou *et al.*, 2011). En particular, las infecciones por DENV-1 fueron asociadas con niveles de viremia elevada y de mayor duración que las infecciones por DENV-2 ó DENV-3 (Tricou *et al.*, 2011; Duyen *et al.*, 2011; Fox *et al.*, 2011). Aunque no determinamos la secuencia genómica para poder asociar posibles diferencias genotípicas que pudieran explicar la diferencia en la severidad de la enfermedad; recientemente, Vu y colaboradores mostraron que el DENV-2 genotipo Asiático 1 tiene una mayor competencia in vivo que el genotipo Asiático/Americano, lo que le permite desarrollar una mayor viremia en los pacientes (Vu *et al.*, 2010).

Por otra parte, en referencia al huésped, se conoce que la inmunidad cruzada juega un papel biológicamente importante con base en las diferencias entre los distintos genotipos virales. Por ejemplo, el DENV-2 genotipo Asiático Sudoriental es menos susceptible que el genotipo Americano para ser neutralizado por anticuerpos anti-DENV-1 (Kochel, 2002). Recientemente, un estudio mostró niveles de viremia más altos en suero de pacientes negativos a IgM específicos contra DENV que en pacientes positivos a IgM (De la Cruz Hernández *et al.*, 2013b). Se conoce que los anticuerpos IgM juegan un papel importante en el control de la infección mediante la fijación del complemento a los antígenos y la posterior captación por células fagocíticas (Ehrenstein and Notley, 2010). Lo anterior sugiere que una respuesta de IgM temprana puede ayudar al huésped a modular la viremia y favorecer los resultados clínicos.

Para recapitular, el amplio espectro clínico que puede resultar de la infección por DENV, se deriva de la compleja interacción entre los factores virales y del hospedero. Es decir, no sólo los factores virales o los del hospedero pueden producir la enfermedad severa: tanto la especificidad de los anticuerpos, ya sean de una respuesta primaria o secundaria; la edad, el género, condiciones coexistentes; así como el serotipo, genotipo o composición antigénica, la viremia y la velocidad de aclaramiento de la viremia pueden influir en la presentación de un cuadro clínico leve o severo.

9. CONCLUSIONES

El fenotipo clínico final en términos de severidad de la enfermedad fue influido por factores del hospedero (infección secundaria) y virales (carga viral). Estos hallazgos fueron apoyados por un análisis de regresión logística que demostró el valor predictivo o pronóstico de los factores dentro de la clasificación de 2009. Por el contrario, cuando se aplicó la clasificación de 1997, no fue posible distinguir factores de riesgo entre pacientes con FD o FHD/SCHD.

Clínicamente, una etapa crítica en determinar la progresión a SD es la fase de transición de fiebre a defervescencia, en la cual pueden ocurrir extravasación plasmática, hemorragia, trombocitopenia o daño de órganos. Este es un periodo crítico para determinar la severidad de la enfermedad. La clasificación de la OMS de 2009 mostró mayor sensibilidad que la de 1997 para detectar casos graves de dengue. Además, la clasificación de 2009 muestra una razón costo-beneficio mejor que la clasificación de 1997.

Entre los signos de alarmas propuestos por la clasificación de la OMS de 2009, encontramos evidencias que apoyan el dolor abdominal, vómito y hemorragia de mucosas. Se sugiere usar el dolor retro-orbital y el exantema no sólo para distinguir el dengue de otras enfermedades febriles, sino también como indicadores de SD. También se sugiere usar la trombocitopenia $\leq 35,000/\mu\text{L}$ como un indicador de SD. Se debería evaluar la inclusión de dolor retro-orbital como signo de alarma dentro de la clasificación de 2009.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en demostrar asociaciones entre la carga viral, la infección secundaria y la severidad del dengue mediante el uso de la clasificación de 2009. Esta clasificación constituye una herramienta apropiada para el

diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de los pacientes con SD, y muy útil para evaluar factores asociados con la progresión de la severidad de la enfermedad.

Asimismo, se observó que el dengue afecta tanto a niños como a adultos y por igual a ambos géneros en el Centro de Chiapas. Por otra parte, se demostró que el embarazo constituye un factor de riesgo para la severidad de la enfermedad.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier, 6th. Ed. Barcelona. 566 pp.

Adam I, Jumaa AM, Elbashir HM, Karsany MS. 2010. Maternal and perinatal outcomes of dengue in Port Sudan, Eastern Sudan. *Virol. J.* 13;7:153.

Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Jänisch T, Kroeger A, Lum LC, Martinez E, Siqueira JB, Thuy TT, Villalobos I, Villegas E, Wills B; on behalf of the European Union, World Health Organization (WHO-TDR) supported DENCO Study Group. 2011. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop. Med. Int. Health.* 16(8):936-948.

Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J. Infect. Dis.* 2012;205(8):1321–9.

Anders KL, Nguyet NM, Chau NV, Hung NT, Thuy TT, Lien le B, Farrar J, Wills B, Hien TT, Simmons CP. 2011. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84(1):127-34.

Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Yenchitsomanus P, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, and Malasit P. 2006. Vascular Leakage in Severe Dengue

Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J. Infect. Dis.* 193:1078-1088.

Baccard-Longere M, Freymuth F, Cointe D, Seigneurin JM, and Grangeot-Keros L. 2001. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:429–431.

Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, Imhoff L, Rodriguez Y, Saborío SI, Mercado JC, Perez L, Videa E, Almanza E, Kuan G, Reyes M, Saenz L, Amador JJ, Harris E. 2006. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of school children in Managua, Nicaragua. *Trop. Med. Int. Health.* 11(6):935–942.

Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, and Harris E. 2010. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS. Pathog.* 6:e1000790.

Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. 2006. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop. Med. and Int. Health.* 11(8):1238-1255.

Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martínez E, Segarra CS, Pleites Sandoval EB, Mishra A, Laksono IS, Lum LC, Martínez JG, Núñez A, Balsameda A, Allende I, Ramírez G, Dimaano E, Thomacheck K, Akbar NA, Ooi EE, Villegas E, Hien TT, Farrar J, Horstick O, Kroeger A, Jaenisch T. 2011. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect. Dis.* 21;11:106.

Basuki PS, Budiyo, Puspitasari D, Husada D, Darmowandowo W, Ismoedijanto, Soegijanto S, Yamanaka A. 2010. Application of revised dengue classification criteria as a severity marker of dengue viral infection in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 41(5):1088-94.

Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WE . 2009. Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 147: 29–32.

Bente DA and Rico-Hesse R. 2006. Models of virus infection. *Drug Discov. Today Dis. Models.* 3(1):97-103.

Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, and O'Connell KF. 1991. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J. Med. Virol.* 33:6–9.

Brausewetter F, Jehle PM, Jung MF, Boehm BO, Brueckel J, Hombach V, Osterhues HH. 2001. Microvascular permeability is increased in both types of diabetes and correlates differentially with serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Horm. Metab. Res.* 33:713-720.

Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. 1987. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81(5):816-20.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38:172–180.

Butthep P, Bunyaratvej A, Bhamarapavati N. 1993. Dengue virus and endothelial cell: a related phenomenon to thrombocytopenia and granulocytopenia in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 24 (Suppl 1): 246–249.

Carlos, C. C., K. Oishi, M. T. Cinco, C. A. Mapua, S. Inoue, D. J. Cruz, M. A. Pancho, C. Z. Tanig, R. R. Matias, K. Morita, F. F. Natividad, A. Igarashi, and T. Nagatake. 2005. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73:435–440.

Chao DY, Lin TH, Hwang KP, Huang JH, Liu CC, King CC. 2004. 1998 dengue hemorrhagic fever epidemic in Taiwan. *Emerg Infect Dis.* Mar;10(3):552-4.

Chitra TV and Panicker S. 2011. Maternal and fetal outcome of dengue fever in pregnancy. *J. Vector Borne Dis.* 48:210–213.

Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. 2005. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes.* 54:2779-86.

Clements, AN. 1992. The Biology of Mosquitoes. Development, Nutrition and Reproduction. Volumen 1. London: Chapman & Hall. 509 pp.

Clyde K, Kyle JL, Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80(23):11418-31.

Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, Després P, Sakuntabhai A. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection* 11:143e156.

Cohen SN, Halstead SB. 1964. Shock associated with dengue infection. I. Clinical and physiologic manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand, 1964. *J Pediatr.* 68:448–56.

Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento EJ, Magalhães MC, Guimarães GF, Lucena-Silva N, de Carvalho EM, Marques ET Jr. 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6):1128-34.

Cummings DA, Iamsirithaworn S, Lessler JT, McDermott A, Prasanthong R, Nisalak A, Jarman RG, Burke DS, Gibbons RV. 2009. The impact of the demographic transition on dengue in Thailand: insights from a statistical analysis and mathematical modeling. *PLoS Med.* 6:e1000139.

De la Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, del Angel RM. 2013a. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with denguevirus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;88(3):446-54.

De La Cruz Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Ortiz-Navarrete V, Ludert JE, Del Angel RM. 2013b. Viral load in patients infected with dengue is modulated by the presence of anti-dengue IgM antibodies. *J Clin Virol.* Jul 8. pii: S1386-6532(13)00248-5.

De Souza, VA, Pannuti CS, Sumita LM, and Andrade HF, Jr. 1997. Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines. *J. Med. Virol.* 52:275–279.

De Souza VA, Fernandes S, Araújo ES, Tateno AF, Oliveira OM, Oliveira RR, Pannuti CS. 2004. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 42(4):1782-4.

De Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR, Domingues RB, Araújo ES, Kuster GW, Pannuti CS. 2007. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J. Clin. Virol.* 39(3):230-3.

Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 368:170-3.

Dirección General de Epidemiología. CENAVE. Panorama Epidemiológico Semana 52 de 2009.

Dirección General de Epidemiología. CENAVE. Panorama Epidemiológico Semana 52 de 2004.

Domingo E and Holland JJ. 1997. RNA Virus Mutations and Fitness for Survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:151–78.

Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeung N, Lundkvist A, Leparco-Goffart I, Duvel V, Vong S, Buchy P. 2011. Clinical and virological features influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential uses as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 5: e124.

Duyen HT, Ngoc TV, Ha do T, Hang VT, Kieu NT, Young PR, Farrar JJ, Simmons CP, Wolbers M, Wills BA. 2011. Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *J. Infect Dis.* 203(9):1292-300.

Eisen HN and Siskind GW. 1964. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*. 3:996-1008.

Elhassan ME, Mirgahani OA, Adam I. 2009. Maternal mortality and stillbirth in central Sudan. *Tropical Doctor*. 39:238-9.

Enders G, and F. Knotel. 1989. Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Infection* 4:218–226.

Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. 2002a. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* 156(1):40–51.

Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. 2002b. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am. J. Epidemiol.* 156(1):52-59.

Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, Rothman AL, Libraty DH. 2004. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J. Infect. Dis.* 189(6):990-1000.

Ehrenstein MR, Notley CA. 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*;10:778–86.

Fernández-Salas, I. 1999. *Biología y control de Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 80 pp.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, and Griffin DE. 2001. *Fields. Virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.

Figueiredo MA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JW, Costa MC, Morato V, Blanton R, Vasconcelos PF, Nunes MR, Teixeira MG. 2010. Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: results of a case control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(6):e699.

Fox A, Le NM, Simmons CP, Wolbers M, Wertheim HF, Pham TK, Tran TH, Trinh TM, Nguyen TL, Nguyen VT, Nguyen DH, Farrar J, Horby P, Taylor WR, Nguyen VK. 2011. Immunological and viral determinants of dengue severity in hospitalized adults in Ha Noi, VietNam. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(3):e967.

García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Gobierno del Estado de Chiapas. Ubicación. Disponible en: <http://www.chiapas.gob.mx/ubicacion>. Consultado el 20 de octubre de 2012.

Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, Erlin, Sutaryo, Porter KR, Halstead SB. 1999. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995–1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(3):412–419.

Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA, 1999. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 180:1429–1435.

Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, and Saroso JS. 1979. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 701–710.

Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, and Sie A. 1981. Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull. WHO* 59, 623–630.

Gubler DJ. 2001. Dengue Fever Viruses. *Encyclopedia of Life Sciences* :1-7.

Gubler DJ. 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27:319–330.

Gubler DJ, Reed D, Rosen L, and Hitchcock JR, Jr. 1978. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:581-589.

Guha-Sapir D, Schimmer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology.* 2(1):1.

Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VC, Rocha B, Levi JE, Souza VA, Boas LS, Pannuti CS, Martelli CM. 2008. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J. Infect. Dis.* 197(6):817-824.

Günther J, Martínez-Muñoz JP, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. 2007. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. *Intervirology.* 50(5):347-52.

Günther J, Ramírez-Palacio LR, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito JS. 2009. Distribution of dengue cases in the state of Oaxaca, Mexico, during the period 2004-2006. *J. Clin. Virol.* 45(3):218-22.

Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS and Cecilia D. 2009. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* Jan 23;6:10.

Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, Vázquez S, Morier L. 1987. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ* 21: 270–279.

Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Vald s L, Cabrera MV, Kourí G. 1999. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *International Journal of Infectious Diseases* 3, 130–135.

Guzmán MG, García G, Kourí G. 2006. El dengue y el dengue hemorrágico: Prioridades de investigación. *Rev Panam Salud Pública.* 19(3):204-15.

Guzman MG, Kouri G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2:33–42.

- Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, and Halstead SB. 2002. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int. J. Infect. Dis.* 6:118–124.
- Haggaz AA, Radi EA, Adam I. 2007. High maternal mortality in Darfur, Sudan. *Int J Gynecol Obstet.* 98:252-3.
- Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1974, 23:974-982.
- Halstead SB. 1997. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Gubler DJ, Kuno G , editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* . Oxon, UK pp. 23-44.
- Halstead SB. 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev. Panam. Salud Publica* 20:407–415.
- Halstead SB y O'Rourke EJ. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 146:201-217.
- Hanley KA, Weaver SC. Arbovirus Evolution. In: Domingo E, Parrish CR, Holland JJ, editors. *Origin and Evolution of Viruses*. Oxford: Elsevier; 2008. pp. 351–392.
- Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36(9):2634-2639.
- Harris E, Videz E, Pérez L, Sandoval E, Téllez Y, *et al.* 2000. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(1-2):5-11.
- Hedman K, Lappalainen M, Söderlund M, Hedman L. 1993. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Microbiol.* 4:123-129.
- Hedman K, Seppälä I. 1988. Recent rubella virus infection indicated by low avidity of specific IgG. *Journal of Clinical Immunology.* 8:214-221.

Herrera-Basto E, Prevots DR, Zarate ML, Silva JL, and Sepulveda-Amor J. 1992. First reported outbreak of classical dengue fever at 1,700 meters above sea level in Guerrero State, Mexico, June 1988. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(6):649-53.

Holland, J.J. (Eds.), *Origin and Evolution of Viruses*. Elsevier, Oxford, pp. 351–392.

Holland JJ, de la Torre JC, and Steinhauer DA. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176:1-20.

Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. 2009. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary Dengue virus infection by human macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80:841–5.

Hsieh YH, Chen CW. 2009. Turning points, reproduction number, and impact of climatological events for multi-wave dengue outbreaks. *Trop. Med. Int. Health.* 14:628–38.

Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, Yeh TM. 2001. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J. Med. Virol.* 63(3):247-51.

ILM. De la dengue et de ses vecteurs. Revisado el 9 de julio de 2012. Disponible en: <http://www.ilm.pf/Dengueetvecteurs-virus>

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:418–427.

Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 1984 Sep;20(3):525-9.

Introducción al PCR en tiempo real. Sistema StepOne y StepOne Plus. Applied Biosystems.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43(10):4977-83.

Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67(2):158-161.

Kalayanarooj S. 2011. Dengue classification: current WHO vs. the newly suggested classification for better clinical application? *J. Med. Assoc. Thai.* 94 Suppl 3:S74-84.

Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, and Siripanichgon K. 2007. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J. Clin. Virol.* 39:76–81.

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, and Burke DS. 1989. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:444-451.

Kneitz RH, Schubert J, Tollmann F, Zens W, Hedman K, Weissbrich B. 2004 A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. *BMC Infect. Dis.* 4:33.

Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, Caceda R, Bautista CT, Montoya Y, Douglas S, Russell KL. 2002. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue hemorrhagic fever. *Lancet.* 360(9329):310-2.

Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. 2006. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 138(1–2):123-30.

Kouri GP, Guzman MG and Bravo RJ. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1987; 81:821-823.

Lahiri M, Fisher D, Tambyah PA. Dengue mortality. 2008. Reassessing the risk in transition countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(10):1011-6.

Lai YL, Chung YK, Tan HC, Yap HF, Yap G, Ooi EE, Ng LC. 2007. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 45(3):935-41.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, and Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 545–551.

Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159–174.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 73:4738–47.

Leo YS, Thein TL, Fisher DA, Low JG, Oh HM, Narayanan RL, Gan VC, Lee VJ, Lye DC. 2011. Confirmed adult dengue deaths in Singapore: 5-year multi-center retrospective study. *BMC Infect. Dis.* 11:123.

Limonta D, Torres G, Capó V, Guzmán MG. 2008. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 5(3):213-4.

Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, García-Rejón JE, Díaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narváez M, Jiménez-Ríos E, Blair CD, Olson KE, Black W 4th, Beaty BJ. 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;71(4):485-92.

Lum LC, Goh AY, Chan PW, El-Amin AL, Lam SK. 2002. Risk factors for hemorrhage in severe dengue infections. *J. Pediatr.* 140(5):629-31.

Lum LC, Abdel-Latif Mel-A, Goh AY, Chan PW, Lam SK. 2003. Preventive transfusion in Dengue shock syndrome-is it necessary? *J. Pediatr.* 143(5):682-4.

Makino N, Maeda T, Sugano M Satoh S, Watanabe R, Abe N. 2005. High serum TNF- α level in type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J. Diab. Complications.* 19:347-55.

Martina B, Koraka P and Osterhaus A. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(4):564-581.

Martínez-Torres E. 2006. La prevención de la mortalidad por dengue: Un espacio y un reto para la atención primaria de salud. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health.* 20(1):60-74.

Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, Guedes MI. 2012. Correction: Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.* 7(7):e41386.

Matheus S, DeParis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. 2005. Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample. *J. Clin. Microbiol.* 43(6):2793-7.

Meltzer E, Schwartz E. A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Travel Med Infect Dis.* 2009 Sep;7(5):278-83.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 427(6972):313-9.

Mourya DT, Gokhale, Basu A, Barde PV, Sapkal GN, Padbidri VS, Gore MM, 2001. Horizontal and vertical transmission of dengue-2 virus in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol.* 45: 67–71.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(1):13-22.

Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Nisalak A, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Libraty DH, 2006. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J. Infect. Dis.* 194: 600–607.

Nardi M, Tomlinson S, Greco MA, Karpatkin S. 2001. Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1 related immune thrombocytopenia. *Cell*;106:551–61.

Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. 2011. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(11):e1397.

Navarrete-Espinosa J, Acevedo-Vales JA, Huerta-Hernández E, Torres-Barranca J, Gavaldón-Rosas DG. 2006. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. *Salud Publica Mex.* 48(3):220-8.

Nelson DL and Cox MM. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. WH Freeman, 5th ed. New York, U.S.A.

Nguyen NM, Tran CN, Phung LK, Duong KT, Huynh Hle A, Farrar J, Nguyen QT, Tran HT, Nguyen CV, Merson L, Hoang LT, Hibberd ML, Aw PP, Wilm A, Nagarajan N, Nguyen DT, Pham MP, Nguyen TT, Javanbakht H, Klumpp K, Hammond J, Petric R, Wolbers M, Nguyen CT, Simmons CP. 2013. A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *J Infect Dis.* May 1;207(9):1442-50.

Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, Lin YS, Le BL, Huang KJ, Lin CF, Do QH, Vu TQ, Lam TM, Yeh TM, Huang JH, Liu CC, Halstead SB. 2005. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(4):370-4.

Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962– 1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:954–71.

Nimmannitya S. 1987. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 18:392–7.

Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokeyhaibulkit K, Perng GC. 2009. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* Mar;40(2):253-62.

Noisakran S, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Hsiao HM, Songprakhon P, Angkasekwinai N, Chokeyhaibulkit K, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. 2012. Role of CD61(+) cells in thrombocytopenia of dengue patients. *Int. J. Hematol.* 96(5):600-10.

NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.

Nunes-Araújo FR, Ferreira MS, Nishioka SD. Dengue fever in Brazilian adults and children: assessment of clinical findings and their validity for diagnosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2003 Jun;97(4):415-9.

Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. 2007. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int. J. Infect. Dis.* 11(3):263-267.

Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. 2006. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect Dis.* 12(6):887-893.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1995. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para la Prevención y Control. Publicación Científica No. 548. Washington, DC. 11 pp.

Paunio, M., K. Hedman, I. Davidkin, M. Valle, O. P. Heinonen, P. Leinikki, and H. Peltola. 2000. Secondary measles vaccine failures identified by measurement of IgG avidity: high occurrence among teenagers vaccinated at a young age. *Epidemiol. Infect.* 124:263–271.

Paunio, M., K. Hedman, I. Davidkin, and H. Peltola. 2003. IgG avidity to distinguish secondary from primary measles vaccination failures: prospects for a more effective global measles elimination strategy. *Expert Opin. Pharmacother.* 4:1215–1225.

Perera, R and Kuhn RJ. 2008. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11(4): 369–377.

Porter KR, Beckett CG, Kosasih H, Tan RI, Alisjahbana B, Rudiman PI Widjaja S, Listiyaningsih E, Ma'Roef CN, McArdle JL, Parwati I, Sudjana P, Jusuf H, Yuwono D, Wuryadi S. 2005. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever in a cohort of adults living in Bandung, West Java, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(1):60–66.

QIAGEN. 2005. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. Segunda edición.

Ramírez-Zepeda MG, Velasco-Mondragón HE, Ramos C, Peñuelas JE, Maradiaga-Ceceña MA, Murillo-Llanes J, Rivas-Llamas R, Chaín-Castro R. 2009. Clinical and epidemiologic characteristics of dengue cases: the experience of a general hospital in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Rev. Panam. Salud Publica.* 25(1):16-23.

Rico-Hesse, R., 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174 (2), 479–493.

Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M.T., Nogueira, R.M., da Rosa, A.T. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230 (2), 244–251.

Rigau-Perez JG. 2006. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infectious Diseases.* 6:297–302.

Rigau-Perez JG and Laufer MK. 2006. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992–1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clinical Infectious Diseases* 42, 1241–1246.

Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. *Virology.* 2005 Apr 10; 334(2):154-9.

Rosado León R, Muñoz Rodríguez MR, Soler Huerta E, Parissi Crivelli A, Méndez Machado GF. 2007. Dengue fever during pregnancy. Cases report . *Ginecol. Obstet. Mex.* Nov;75(11):687-90.

Rosen L. 1977. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 26 (3) 337-343.

Rosen L. 1986. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. *S. Afr. Med. J.* 11;Suppl:40-2.

Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, Nagatake T.

2004. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 138:299–303.

Sánchez-Burgos GG, López-Alvarado MA, Castañeda-Desales D, Ruiz-Gómez J, Ramos-Castañeda J. 2008. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del virus dengue en universitarios de Tabasco, México. *Salud Publica Mex.* 50(5):362-6.

Sanchez I, and Ruiz B. 1996. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J. Gen. Virol.* 77:2541–5.

Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.* 120:653–669.

Sariol, C.A., Pelegrino, J.L., Martinez, A., Arteaga, E., Kouri, G., Guzman, M.G. 1999. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen years- old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (6), 994–1000.

Steiner, L. A., and H. N. Eisen. 1967. Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J. Exp. Med.* 126:1161–1183.

Steiner and Eisen. 1967. The relative affinity of antibodies synthesized in the secondary response. *Journal of experimental Medicine.* 126:1185-1205.

Streatfield R, Bielby G, Sinclair D. 1993. A primary dengue 2 epidemic with spontaneous hemorrhagic manifestations. *Lancet.* 342:560–1.

Suhrbier A, La Linn M. 2003. Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends Immunol.* 24: 165–8.

Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR. 2009. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci.* Feb 4;16:17.

Tan PC, Soe MZ, Si Lay K, Wang SM, Sekaran SD, Omar SZ. Tan PC, Soe MZ, Si Lay K, Wang SM, Sekaran SD, Omar SZ. 2012. Dengue infection and miscarriage: a prospective case control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(5):e1637. Epub 2012 May 8.

Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(5):566–572.

Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, Plumelle Y, Fonteau C, Dussart P, Césaire R. 2008. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(6):990-8.

Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. 2009. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect. Disord. Drug Targets.* 9(3):327-43.

Tricou V, Minh NN, Farrar J, Tran HT, Simmons CP. 2011. Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(9):e1309.

Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. 2012. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J. Innate Immun.* 3:59–71.

Van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *Am J Trop Med Hyg.* 86(1):166-70, 2012.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* 181, 2–9.

Vorndam V, Kuno G. 1997. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York, CAB International. 313–333.

Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Farrar J, Wills B, Lennon NJ, Birren BW, Buchy P, Henn MR, Simmons CP. 2010. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in Vietnam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 20;4(7):e757.

Wallace MJ, Smith DW, Broom AK, Mackenzie JS, Hall RA, Shellam GR, McMinn PC. 2003. Antibody-dependent enhancement of Murray Valley encephalitis virus virulence in mice. *J. Gen. Virol.* 84: 1723–8.

Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, Lin SC, Ho ST, Huang JH, King CC. 2003. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. *Virology.* 305:330-338.

Watts DM, Porter KR, Putratana R, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead, SB. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. *Lancet.* 354(9188):1431-4.

Weaver SC and Vasilakis N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Inf. Gen. Evol.* 9:523-540.

Werblin TP, Kim YT, Quagliata F, Siskind GW. 1973. Studies on the control of antibody synthesis. 3. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology*;24(3):477-92.

Whitley E, Ball J. 2002. Statistics review 4: sample size calculations. socio-economic position. *Critical Care.* 6: 335-41

WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117, revised January 2012.

WHO. 1975. Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever. Geneva: WHO (Southeast Asian and Western Pacific Regional Offices).

WHO. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization.

WHO. 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, World Health Organization.

WHO. Report of the meeting of the Scientific Working Group on Dengue (Geneva). 2006:1–168. Revisado el 12 de julio de 2007. Disponible en: http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm.

Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. 2004. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* 9:1022–9.

Wolter T, Gassmann C, Vetter V, Bauer G. 1997. Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections. *Clin. Lab.* 43:125-135.

Yeh WT, Chen RF, Wang L, Liu JW, Shaio MF, Yang KD. 2006. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Oct;48(1):84-90.