

ARTÍCULO DE REVISIÓN

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Dengue y fiebre hemorrágica del dengue, un problema de salud mundial

Dra. María G. Guzmán,¹ Lic. Gissel García² y Dr. Gustavo Kourí³

RESUMEN

Desde épocas tan remotas como 1635 y 1699, el dengue ha sido considerado la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor importancia médica. Dada la importancia de esta entidad al nivel mundial y particularmente para la región de las Américas, se hizo necesaria la búsqueda de una solución inmediata para abortar el desarrollo de la forma grave de la enfermedad. En este estudio se presentó una actualización del tema en aspectos tan importantes como: el espectro clínico de la enfermedad, las características del agente etiológico y los mecanismos inmunopatogénicos que tienen lugar en su interacción con el hospedero.

Palabras clave: Dengue, enfermedad, patogénesis, remisión.

INTRODUCCIÓN

El 3 de diciembre se conmemora el natalicio del sabio cubano Carlos Juan Finlay, descubridor de la transmisión de enfermedades por vectores biológicos y particularmente del agente transmisor de la fiebre amarilla (FA), el mosquito *Aedes aegypti*. Tan temprano como en 1881, Finlay presentó sus evidencias de la transmisión de esta enfermedad, uno de los principales azotes de la humanidad en los siglos XVII hasta principios del XX. A pesar de este gran descubrimiento, no es hasta 1901 en que la FA es eliminada de La Habana, Cuba y posteriormente de Panamá, Veracruz y

otras ciudades y países del hemisferio, donde esta entidad era causa importante de morbilidad y muerte.¹

Similar a la FA, el dengue, enfermedad viral transmitida también por *Aedes aegypti*, fue reconocida desde épocas tan remotas como 1635 y 1699 en el Caribe y Centroamérica, respectivamente.² El origen del virus ha sido objeto de muchas discusiones. En un inicio (1883) se especulaba que había surgido en África y distribuido alrededor del mundo con la trata de esclavos. Sin embargo, hacia 1956 se propone que se originan en un ciclo forestal entre primates y mosquitos en la península de Malasia. *Aedes aegypti*, especie del nuevo

¹ Doctora en Ciencias Médicas. Profesora Titular. Investigadora Titular. Departamento de Virología, Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Instructora. Investigadora Agregada. Departamento de Virología, Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector, IPK.

³ Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Investigador Titular. Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector, IPK.

mundo, es considerado el principal vector de los virus del dengue. De origen africano, se piensa convivía en un ambiente peridoméstico en las aguas almacenadas de las aldeas africanas. La especie se adaptó a los humanos y la trata de esclavos que tuvo lugar durante los siglos XVII, XVIII y XIX, contribuyó a la diseminación del mosquito en todo el mundo, fundamentalmente en las Américas, donde se adaptó al ambiente urbano.³ El virus dengue, así transportado, tanto en los esclavos como en su vector, se asentó del otro lado del Atlántico. Durante los siglos XVIII y XIX, pandemias de dengue fueron reportadas en períodos de 20 a 30 años, principalmente en el Caribe y el sur de EE.UU. Durante la primera mitad del siglo XX las epidemias se produjeron en intervalos más cortos y sobre todo a partir de los años 60, el dengue sustituyó a la FA como problema de salud, en la región.⁴

El dengue, enfermedad viral aguda, puede ser causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus dengue. Se transmite al hombre principalmente por *Aedes aegypti*.⁴ Dada la importancia de esta entidad a escala mundial y en particular para la región de las Américas, en este estudio se presenta una actualización del tema.

LA ENFERMEDAD

El dengue, al nivel global, es considerado la enfermedad viral transmitida por mosquitos de mayor importancia médica. Su espectro clínico puede variar desde individuos asintomáticos hasta otros en los que la infección tiene un desarrollo más severo, con sangramiento y choque. En la mayoría de los infectados, la infección evoluciona en forma asintomática, aunque la fiebre indistinguible es observada con frecuencia en niños pequeños. El período de incubación después de la picadura del mosquito se ha estimado en 3 a 8 d como promedio. Dos cuadros clínicos principales se reconocen, la fiebre del dengue (FD), y su forma severa, la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue (FHD/SCD). Ambas formas clínicas se presentan en niños mayorcitos y adultos aunque la enfermedad severa se ha asociado principalmente a la niñez, sobre todo en el Sudeste asiático y Pacífico occidental.⁵ En áreas donde circulan virus de más de un serotipo, o en

las que tienen lugar infecciones secuenciales causadas por virus de diferentes serotipos, puede tener lugar la forma más severa de la infección, caracterizada por hemorragia y choque, este último, resultado de la pérdida del volumen intravascular por la salida de plasma.

La FD se caracteriza por fiebre elevada (= 38 °C), frecuentemente bifásica, de comienzo abrupto, acompañada de cefalea intensa, mialgia, artralgia, erupción maculopapular y leucopenia. En algunos casos se presentan sangramientos menores como petequias, epistaxis y gingivorragia. Su pronóstico es en general benigno, y su convalecencia puede acompañarse de fatiga prolongada durante varios días sobre todo en los adultos.

La extravasación de líquidos caracteriza a la FHD/SCD.

De comienzo similar a la FD, al tercer o cuarto día de evolución, coincidiendo con la caída de la fiebre, se produce un agravamiento de la enfermedad; puede observarse sangramiento y tendencia al desarrollo de choque. Según la OMS, la fiebre, algún sangramiento (al menos una prueba de torniquete positiva), la trombocitopenia de menos de 100 000 plaquetas/mm³ y un aumento del hematócrito en 20 % o más, o algún signo clínico de extravasación de líquidos, como derrame pleural y ascitis, caracterizan al dengue hemorrágico (DH). Las petequias, epistaxis, sangramiento gingival y por venipuntura, hematemesis y sangramiento vaginal pueden observarse. Algunos pacientes evolucionan al choque presentando sudoración profusa, pulso rápido y débil, estrechamiento de la presión arterial o hipotensión, y piel fría y sudorosa.^{5,6} La evolución hacia la fiebre hemorrágica en general es precedida por los llamados signos de alarma; entre ellos se identifican los vómitos frecuentes, el dolor abdominal persistente, cambios en el nivel de conciencia, caída brusca de las plaquetas e incremento rápido del hematócrito.^{5,6} La FHD/SCD puede presentarse en cuatro grados de severidad, el choque caracteriza los grados III y IV.

El tratamiento del dengue es de sostén. El paciente con la forma grave de la enfermedad requiere de un diagnóstico clínico temprano, y de la restitución temprana y adecuada de los líquidos. En los casos muy severos, pueden observarse trastornos metabólicos que hacen más difícil el manejo clínico del paciente. A diferencia de la FD, el paciente de FHD/SCD se recupera rápido en 2 a 3 d.

Cada vez con mayor frecuencia se reportan las llamadas manifestaciones inusuales, en el desarrollo del dengue. El fallo hepático fulminante, la miocardiopatía, y los trastornos neurológicos (encefalitis y encefalopatía) son las observadas con mayor frecuencia. La hipotensión, el edema cerebral, las hemorragias focales y el fallo hepático fulminante pueden ser la causa de la encefalopatía.⁷⁻⁹ El incremento en las enzimas hepáticas (aspartatoaminotransferasa y alanina aminotransferasa) ha sido reportado en el DH con bastante frecuencia.¹⁰ Aunque el virus dengue se ha detectado en cerebro, hígado y miocardio, no está bien definido si alguna de estas manifestaciones son producto de la acción directa del agente en el tejido o de una respuesta de hipersensibilidad o de tipo autoinmune, o ambas. Recién se ha reportado en pacientes de FD trastornos visuales en el desarrollo de la enfermedad y en particular la presencia de hemorragias en la retina.¹¹

Aunque el dengue en cualquiera de sus formas clínicas es una enfermedad de evolución rápida, existen pocos estudios que presentan un seguimiento clínico de los pacientes una vez concluida la fase aguda. *González* y otros reportaron la presencia de cefalea, astenia y artralgia en 76 pacientes adultos que desarrollaron FHD/SCD por Den 3, aun después de 6 meses de la enfermedad.¹²

La clasificación clínica de la FHD/SCD según la OMS ha sido de gran utilidad para el manejo clínico de los casos, sin embargo, cada vez con mayor frecuencia se observan enfermos que no cumplen totalmente los criterios establecidos en la clasificación. *Harris* y otros, en 2000,¹³ en el transcurso de una epidemia de dengue en Nicaragua reportaron casos de SCD en ausencia de sangramiento y trombocitopenia. Existen numerosos reportes de enfermos graves que no cumplen con todos los criterios establecidos.

La reducción del impacto de la enfermedad es un aspecto fundamental en el control y la prevención del dengue y se estima que la aplicación de protocolos clínicos estandarizados para la clasificación y el manejo terapéutico de los enfermos debe permitir la reducción de la mortalidad y la letalidad. La expansión del dengue hacia nuevas áreas geográficas ha conllevado a nuevas experiencias en el manejo terapéutico, así como una mayor riqueza en la observación de la clínica de la

entidad. La evaluación de la clasificación actual de la FHD/SCD aplicando protocolos clínicos estandarizados en diferentes condiciones epidemiológicas es una prioridad de investigación. La determinación de los signos de alarma clínicos y de laboratorio como marcadores de pronóstico de DH, la utilidad y significado del ultrasonido y la comparación del cuadro clínico del DH en niños y adultos y en pacientes del sudeste asiático y de las Américas son aspectos de importancia que deben ser estudiados.¹⁴

AGENTE ETIOLÓGICO

El virus del dengue es un virus ARN de simple cadena polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. Pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* y existe como un complejo formado por 4 serotipos (Den 1 al Den 4) para los cuales se ha descrito una homología de secuencia de 70 % aproximadamente. Esta homología, mayor entre los serotipos 1-3 y 2-4, parece diferir en su origen evolutivo.¹⁵

El genoma viral codifica para 3 proteínas estructurales, la capsida (C) que rodea y protege al ácido nucleico, la proteína de membrana (M) y la envoltura (E). La glicoproteína E es la principal en relación con la biología del virus y la inmunidad humoral. Ella media la fusión de membrana, induce la formación de anticuerpos neutralizantes, inhibidores de la hemaglutinación y anticuerpos inmunoamplificadores, además en ella se localiza el receptor viral. La utilización de anticuerpos monoclonales, ha permitido identificar 3 dominios antigénicos en la proteína E que correlacionan adecuadamente con los 3 dominios definidos en su estructura molecular (dominios I, II y III). La proteína prM (precursor de la proteína M) protege a la proteína E del pH ácido del medio, durante la maduración viral que evita su cambio conformacional irreversible.¹⁵

El genoma de este agente también codifica para 7 proteínas no estructurales 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Se ha sugerido que la proteína NS1 participa en la maduración viral. La proteína NS3 tiene función helicasa y proteasa y en la NS5 radica la función polimerasa del virus.¹⁶

Los 4 serotipos del dengue son filogenéticamente diferentes y se agrupan junto a los flavivirus transmitidos por mosquitos. Aunque no se conoce su origen exacto, estudios actuales sugieren que se originó de un virus de primate no humano hace casi 1 000 años, y la transmisión al hombre ocurrió en un período entre 320 a 125 años. Su origen puede ser situado en el continente africano o asiático. El pequeño número de cepas selváticas existentes no permite obtener datos filogenéticos más precisos. No se conoce con exactitud por qué ni cómo surgieron los 4 serotipos, aunque pudieran haber surgido a partir de poblaciones de primates separadas desde el punto de vista geográfico o ecológico, que permitiera la evolución independiente de los serotipos. Se estima que la diversidad genética del virus dengue debe haber ocurrido casi de manera simultánea para los 4 virus y quizá durante el siglo pasado.¹⁷

La variación genética observada en cada serotipo ha permitido su integración en genotipos. El estudio del gen que codifica para la proteína E ha sido el más utilizado para la clasificación. Las cepas de Den 2 y de Den 3 de origen asiático se han asociado al desarrollo de epidemias de FHD/SCD. Por otra parte, los llamados genotipos americanos de estos 2 tipos virales no se han relacionado hasta el momento con la forma severa de la enfermedad.¹⁸ Los estudios realizados por *Leitmeyer* y otros, han demostrado la presencia de determinantes de virulencia localizados en la proteína E y en el extremo 3' no codificante.¹⁹ Cepas que contienen estos cambios muestran una mayor capacidad de replicación en monocitos, cultivos de células endoteliales y en mosquitos *A. aegypti*, lo que sugiere una mayor virulencia.²⁰

Estudios actuales han demostrado la presencia de varias poblaciones virales en un mismo huésped (quasispecies) así como la recombinación entre cepas de un mismo serotipo. El significado de estos hallazgos y particularmente, la diversidad genética de los virus del dengue, pueden tener implicaciones en la emergencia de estos agentes con la producción de cepas productoras de una mayor viremia, severidad clínica y mayor capacidad de transmisión; aunque también pudiera asociarse a la aparición de virus de antigenicidad alterada o a cambios de tropismo.²¹

INMUNOPATOGENESIS. EVIDENCIAS E HIPÓTESIS

El conocimiento de las interacciones hospedero-parásito que se desarrollan en una infección, facilita el entendimiento de los mecanismos inmunopatogénicos que tienen lugar en algunas de estas, por ejemplo, el dengue. Ello, además, hace expedito el camino al hallazgo de inmunógenos que estimulen respuestas protectoras que, a la vez que controlarían la infección, evitarían el desarrollo de mecanismos deletéreos de naturaleza inmune.

La patobiología de los *Flavivirus* ha sido revisada por varios autores.²²⁻²⁴ El primer foco de infección en el hospedero, después de la inoculación del virus por el vector apropiado, es la piel. Desde allí, la infección se disemina a los nódulos linfáticos regionales, dando lugar a la viremia primaria. La progenie viral es vertida hacia el plasma y toma diferentes órganos, en dependencia de la afinidad por los tejidos. El virus dengue parece tener mayor afinidad por las células del sistema fagocito mononuclear.²⁵

Entre el tercer y séptimo días de la infección tiene lugar la pérdida de plasma que caracteriza a la FHD, período en que ocurre la recuperación de los pacientes con fiebre dengue. En casos fatales, el examen histológico de los vasos sanguíneos no evidencia destrucción del endotelio. Esta ausencia de causas anatómicas ha conducido a considerar que la rápida pérdida de plasma es causada por fenómenos funcionales.²⁶

Existen muchas hipótesis que tratan de explicar el incremento de la incidencia de la forma severa de la enfermedad después de la infección heterotípica por virus dengue. El primer indicio de una base inmunológica para el desarrollo de la FHD fue la observación, en 1960, de que más de 85 % de los niños que en Bangkok desarrollaron este cuadro, habían tenido altos títulos de anticuerpos de reactividad cruzada, lo cual sugería una infección previa con el virus.²⁶ Esto sentó las bases para plantear que la FHD es más común en las infecciones secundarias que en las primarias. La hipótesis fue confirmada tiempo después en estudios prospectivos hechos en Tailandia.²⁷ Estas observaciones se sustentaron, además, en las características de las epidemias que tuvieron lugar en Cuba,²⁸ donde en la infección por virus dengue 2,

en 1981, se reportaron muchos casos de FHD en pacientes que habían padecido la infección por virus dengue 1 en 1977.

La respuesta inmune humoral a una infección primaria por un determinado serotipo origina anticuerpos neutralizantes capaces de proteger al individuo contra el virus homólogo y, en menor medida, contra los heterólogos. Frente a variantes de estos últimos, pueden desarrollarse anticuerpos subneutralizantes o no neutralizantes. Estos anticuerpos se consideran relacionados con los fenómenos inmunopatogénicos que caracterizan las formas graves de esta infección. En ese sentido, se ha descrito el llamado efecto de *amplificación dependiente de anticuerpos* (ADA)²⁹ que transcurriría de la manera siguiente: durante una infección secundaria con serotipo heterólogo se formarían inmunocomplejos (I-C) cuyos anticuerpos serían menos eficientes en la neutralización de la partícula viral. Estos I-C, como regularmente ocurre en otras interacciones antígeno-anticuerpo, serían internalizados por las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), al interactuar con los receptores Fc- γ tipo I (CD64) y II (CD32) en ellas presentes. Se favorecería de esta manera la diseminación viral, porque estos I-C entran a las células hospederas. Otras células contribuirían a la extensión de la infección, entre ellas otros fagocitos ampliamente distribuidos en los tejidos. Por último, como consecuencia de la lisis por efecto citopático del virus, o por interacción de las células infectadas con mecanismos efectores del sistema inmune, factores flogísticos son liberados al medio extracelular, los cuales están implicados en el desencadenamiento de la forma grave de la enfermedad.³⁰

La FHD/SCD detectada en algunos niños menores de 1 año, sin antecedentes de exposición al virus, es otra importante evidencia epidemiológica en favor de la infección secuencial como factor de riesgo. En ellos, probablemente, el cuadro grave era causado por los anticuerpos maternos.³¹

El estudio de los factores flogísticos antes mencionados así como de otros mediadores solubles, ha evidenciado que la coagulopatía intravascular, la efusión pleural y el aumento de la permeabilidad vascular con pérdida de plasma, observadas en la forma severa de la enfermedad,

podrían estar atribuidas, al menos en parte, a los efectos de citoquinas como IL-8, IL-18 e IFN- γ , detectadas en el suero y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y asociadas con la severidad de la FHD.^{32,33} Otros, en cambio, se han visto relacionados con la clarificación viral, la recuperación del hospedero y la protección. Tal es el caso de la IL-12, que se ha encontrado elevada en pacientes que sufren la forma clásica y ausentes en aquellos con FHD.³³

Los daños inmunológicos por reactividad cruzada son, con frecuencia, rasgos de la enfermedad por *Flavivirus*.³² El estudio de la respuesta de células T al virus dengue ha mostrado evidencias de la participación, no menos importante, de estas en la inducción del cuadro severo de la enfermedad.³² Se ha corroborado la existencia de clones de células T virus específicos, capaces de responder solo al serotipo homólogo. Otros, en cambio, presentan reactividad cruzada con 1, 2 o los 3 serotipos heterólogos restantes, así como contra otros flavivirus.³⁴ El reconocimiento de estas células de reactividad cruzada está dirigido, con más frecuencia, a los epítopes sobre las proteínas no estructurales más conservadas. Entre ellas, la NS3 parece ser el blanco principal de linfocitos T CD4+ y CD8+.³⁵

Varios estudios avalan la hipótesis sobre la activación de linfocitos T y la producción de citoquinas como factores importantes en la patogénesis de la FHD. Diferentes autores han encontrado altos niveles de TNF α , IFN γ e IL-2 asociadas a cuadros de FHD,^{33,36} así como altos niveles de receptores CD8 soluble, CD4 solubles y receptores de IL-2 en niños con FHD.³⁶

¿Cómo pueden relacionarse la reactividad cruzada, la acción citotóxica y la producción de citoquinas de las células T CD4+ para producir el fenómeno inmunopatológico? Después de la infección primaria, existen clones de memoria de linfocitos T CD4+ y T CD8+ cuyos niveles de activación se han visto aumentados en individuos con FHD durante el transcurso de la infección secundaria. Las células TCD4+ pueden inducir el fenómeno inmunopatológico a través de 2 mecanismos: la citotoxicidad o la liberación de citoquinas, o ambas. La activación del primero de ellos puede, a su vez, cursar en 2 caminos: la liberación de perforinas y granzimas de las células citotóxicas sobre la

célula infectada o la interacción del ligando FAS (FAS-L) sobre la célula T con la molécula FAS sobre la célula blanco. Estudios *in vitro* muestran que, cuando se activa la vía FAS/FAS-L, la lisis tiene lugar no solo sobre las células infectadas, sino también sobre las células vecinas que no han estado aún expuestas al virus y que en sus membranas expresan la molécula de FAS, que contribuye con la amplificación de la enfermedad. De ocurrir este mecanismo de destrucción celular *in vivo*, pudiese conducir al desarrollo de diferentes enfermedades que tienen lugar durante la FHD. Como consecuencia de la activación con serotipos heterólogos, los linfocitos de memoria T CD4+ con reactividad cruzada secretan citoquinas como las ya mencionadas (IFN γ , TNF α y TNF β), las cuales han sido detectadas en altas concentraciones en el plasma de individuos con FHD.³⁷

Los intervalos entre infecciones es otro aspecto que se ha relacionado con la ocurrencia de la FHD. Estudios epidemiológicos iniciales realizados en el sudeste asiático predecían que la FHD/SCD ocurriría solo en un intervalo de 5 años, sin embargo, los reportes cubanos demostraron un incremento de la severidad marcado, con intervalos mayores (20 años) entre una infección primaria por Den 1 y una secundaria por Den 2. Al comparar las epidemias de 1981 y 1997 reportadas en Cuba (con la misma secuencia de infección), se observó que la tasa de muerte por 10 000 infecciones secundarias de Den 2 fue 38,5 veces mayor, 20 años después, que a los 4 años.³⁸ Estas evidencias se sustentan en la demostración de respuestas de linfocitos de memoria celular de reactividad cruzada para virus dengue, detectados 20 años después de la infección primaria.³⁹

Las evidencias cubanas, una vez más, fueron corroboradas en un brote de dengue 3 que tuvo lugar entre 2001 y 2002. En esta ocasión solo ocurrieron casos de FHD en adultos con infección secundaria, los que, como ya se referió, poseían anticuerpos contra Den 1 de más de 20 años.⁴⁰ Se reafirma entonces que la infección por virus Den 1 lleva consigo un tiempo de vida media de sensibilización para que se produzca la forma severa de la enfermedad, si la infección subsiguiente es con un virus DEN-2 o DEN-3, genotipo asiático.⁴⁰ Estos hallazgos constituyen nuevos retos a afrontar en el desarrollo de vacunas que ofrezcan una protección de larga duración.

Otro factor importante, al parecer, es la activación del sistema de complemento. Numerosos estudios sugieren que este sistema proteico está asociado a la pérdida de plasma, pues niveles elevados de C3 y C1q han sido detectados en pacientes que sufren la forma severa de la enfermedad.⁴¹ Se plantea que la cascada del complemento podría ser activada por los I-C circulantes. Los niveles de anticuerpos se elevan con mayor rapidez en infecciones secundarias por virus dengue y de esta forma, los altos títulos de anticuerpos son alcanzables antes de la desaparición de la viremia, que aumenta el potencial para la formación del complejo inmune.²²

Las evidencias experimentales ya citadas contribuyeron a la elaboración de un modelo para explicar las bases inmunológicas del síndrome de pérdida capilar en la FHD.^{35,36} Este plantea que, la pérdida de plasma en infecciones secundarias por virus dengue es por causa de un efecto sinérgico entre el IFN γ , TNF α y proteínas activadoras del complemento en las células endoteliales unidas a un mecanismo de regulación positivo, donde el fenómeno de ADA incrementa el número de células presentadoras de antígeno que estimulan a los linfocitos de memoria de reactividad cruzada CD4+ y CD8+. La activación de macrófagos y linfocitos induce la producción de citoquinas y mediadores químicos los cuales ocasionan el choque por pérdida de la capilaridad.^{22,23}

En otra hipótesis se relaciona el fenómeno de reactividad cruzada entre proteínas del virus y aquellas pertenecientes a la cascada de la coagulación. Se plantea la existencia de una homología estructural entre una secuencia conservada de la proteína de envoltura de los *Flavivirus* y ciertas secuencias de factores de la cascada de la coagulación, específicamente el plasminógeno y su activador, que pudieran estar vinculadas con la aparición del cuadro hemorrágico.⁴²

La actividad de la plasmina, forma activa del plasminógeno, está modulada fisiológicamente por un antagonista, a 2 antiplasmina, que se une a la serina del sitio activo en el complejo plasminógeno/plasmina. Se plantea que los anticuerpos producidos ante la infección por virus Den 4, específicos a la proteína E, reconocen una secuencia similar en el plasminógeno, que provoca un impedimento estérico el cual bloquea la unión del antagonista,

esto constituye una hipótesis posible de la alteración hemostática en pacientes con anticuerpos de reactividad cruzada.⁴²

Otros autores, en cambio, han analizado las formas virulentas de ciertas variantes virales y plantean que las formas graves de la enfermedad por *Flavivirus* pudieran estar ligadas además, a un determinismo genético de la virulencia. Se asocia, de esta forma, la aparición de cuadros graves de la enfermedad a determinadas cepas virales o mutantes de estas.⁴³ Se especula que, tras una infección primaria (por ejemplo al serotipo 1), el repertorio de anticuerpos neutralizantes generados es capaz de eliminar la infección causada por un serotipo viral diferente (por ejemplo, al serotipo 2) antes que, en los individuos por segunda vez infectados, tenga lugar el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa específica contra el agente viral. Esto se explica porque, como consecuencia del proceso de maduración de la afinidad, los anticuerpos generados en la primoinfección son capaces de reconocer determinantes antigénicos mayoritarios comunes en la superficie de la partícula viral del serotipo 2. De esta forma son eliminadas, en su mayoría, las partículas virales durante la segunda infección y, en consecuencia, los individuos desarrollan un cuadro clínico benigno o, en muchos casos, asintomático. Sin embargo, en otros casos, partículas virales escapan a la neutralización, pues en el proceso de síntesis de sus proteínas estructurales no son expresados aquellos determinantes comunes al serotipo causal de la primoinfección. Cuando son transmitidas y, de forma mayoritaria se multiplican en otros individuos con igual historia primaria de infección y por tanto con igual repertorio de anticuerpos neutralizantes, son capaces de desarrollar en estos el cuadro más severo de la enfermedad. Los anticuerpos predominantes en estos individuos son, por tanto, anticuerpos que al no poder neutralizar la infección, por medio de su porción Fc se unen a diferentes tipos celulares donde encuentran los receptores correspondientes y tiene lugar el proceso de inmuoamplificación dependiente de anticuerpos.⁴⁴

Estudios de epidemiología molecular sugieren que, diferencias entre las cepas virales son importantes en determinar la incidencia de FHD.¹⁸

Otros elementos importantes son los factores del hospedero como: edad, estado nutricional, factores genéticos e inmunológicos,^{45,46} los cuales contribuyen al desarrollo de las formas graves de la enfermedad.

Por lo tanto, se podría concluir que, para la comprensión de los fenómenos inmunopatológicos desencadenados como consecuencia de la infección por virus dengue, deben ser integrados múltiples factores: *factores de riesgo individuales* (presencia de anticuerpos antidengue, edad, sexo, raza, portador de enfermedades crónicas), *epidemiológicos* (vector e intervalo entre infecciones) y *factores relacionados con el virus* (serotipo y virulencia de la cepa),⁴⁶ los que, como consecuencia de su interacción, ocasionan el desarrollo de la forma grave de esta enfermedad.

EL DIAGNÓSTICO

La infección por virus dengue es una infección aguda, con un desenvolvimiento abrupto, por lo tanto, el conocimiento de la cinética de los diferentes marcadores en su evolución, es de vital importancia en el enfrentamiento de su diagnóstico ¿cuáles son estos marcadores y cómo abordarlos?

La detección del virus constituye la primera de las evidencias y, por tanto, la prueba fehaciente de la ocurrencia de la infección. Durante los 3 primeros días, antes del comienzo de la fiebre y de 4 a 5 d después de esta, el virus puede ser detectado en sangre.

Los anticuerpos, en la infección por dengue, describen una cinética que varía entre una infección primaria y una infección secundaria, por lo que, su detección en el suero es diferente entre ambas. En la infección primaria tiene lugar un aumento lento y gradual de los anticuerpos IgM, los que pueden ser detectados en más de 95 % de los casos a partir del quinto día de la enfermedad. Los anticuerpos IgG en cambio, se elevan hacia el séptimo a décimo día de la fiebre. A diferencia de la infección primaria, en los casos con una infección secundaria se produce un incremento muy temprano de los anticuerpos, y pueden detectarse elevados títulos a partir del segundo día. En un pequeño número de enfermos con infección

secundaria, los anticuerpos IgM pueden no ser detectados.^{5,47}

El estudio de los anticuerpos IgM antidengue no permite determinar con certeza el serotipo infectante, sin embargo, recientemente, *Vázquez* y otros demostraron que los niveles de densidad óptica a los 4 serotipos del virus tanto en muestras de pacientes con una infección primaria o secundaria, eran más elevados al serotipo infectante.⁴⁸ Aunque los anticuerpos IgG pueden mostrar algún grado de especificidad de serotipo en pacientes con infección primaria, en general se considera que la respuesta de anticuerpos es serotipo cruzada por lo que el estudio de estas inmunoglobulinas, al menos mediante las técnicas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación (IH), no permite definir el serotipo infectante.

Los anticuerpos neutralizantes antidengue son los de mayor especificidad que permiten en un gran número de casos determinar el serotipo que infectó al individuo, principalmente si se estudian muestras de suero colectadas con posterioridad a la etapa aguda de la enfermedad, procedentes de pacientes con una infección primaria o secundaria.⁴⁷

Reportes recientes demuestran la elevación de los anticuerpos IgA e IgE durante la infección aguda por dengue. Los primeros han sido propuestos como marcadores de infección reciente y los segundos como posibles marcadores de pronóstico.^{49,50} Se requieren de estudios más profundos que permitan definir exactamente el significado y papel de estos anticuerpos, desde el punto de vista de la respuesta inmune y la patogenia de la enfermedad así como su valor diagnóstico y pronóstico.

La detección de anticuerpos IgM a dengue permite el diagnóstico de una infección reciente. Estas inmunoglobulinas pueden detectarse en sangre hasta 3 meses después del comienzo de la fiebre. Diferentes formatos de ensayos inmunoenzimáticos y principalmente el ELISA de captura de IgM, las tiras reactivas y el sistema ultramicroELISA (UMELISA/Dengue) son ampliamente empleados en el diagnóstico de rutina como apoyo a la vigilancia de laboratorio. Estos sistemas muestran cifras de sensibilidad y especificidad mayores a 95 % en dependencia del método, fuente de antígeno viral y del conjugado empleado.^{5,50}

Un paciente al cual se le detecte la presencia de anticuerpos IgM a dengue debe considerarse como un caso probable y debe ser notificado a las autoridades de salud. De demostrarse seroconversión en la presencia de anticuerpos IgM en 2 muestras de suero, una tomada en etapa aguda de la enfermedad y la segunda 7 a 10 d después, o seroconversión de anticuerpos IgG o incremento de 4 veces o más en el título de estos demostrado mediante ELISA de IgG o IH, debe considerarse como un caso con infección confirmada por dengue. Lógicamente, los antecedentes clínicos y epidemiológicos que acompañan al paciente son de la mayor importancia para la evaluación final del diagnóstico.⁵

El serotipo infectante puede detectarse mediante el aislamiento viral, la detección de su genoma o de algún antígeno viral. Los cultivos de mosquitos y principalmente de células de línea *Aedes albopictus*, C636 son los más empleados en la práctica diaria. Otros cultivos como células de *Aedes pseudoscutellaris*, (AP61), cultivos de células de mamífero y la inoculación intracerebral en ratones lactantes también se han empleado, aunque con menor sensibilidad. La inoculación intratorácica de mosquitos y en particular de *Toxorhynchites amboinensis* es el método de mayor sensibilidad para el aislamiento de estos agentes. La inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos a los 4 serotipos permite la identificación viral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*) y el ELISA de detección de antígeno también han sido empleados.^{50,51}

La PCR ha revolucionado el diagnóstico virológico. Se han empleado diferentes protocolos, de los cuales se destacan aquellos que detectan la presencia del gen que codifica la envoltura viral o alguno de los genes que codifican las proteínas no estructurales. La PCR anidada (nested/PCR), de mayor sensibilidad es ampliamente utilizada.^{49,52}

Recientemente, se han impuesto sistemas más sensibles que permiten detectar y cuantificar el ácido nucleico viral presente en el suero aun en presencia de un bajo número de copias. La PCR en tiempo real ha sido aplicada con éxito en la detección y cuantificación de dengue en muestras de suero y linfocitos de sangre periférica. El ensa-

yo se realiza en un solo vial lo que disminuye las posibilidades de contaminación, la señal que se produce en las muestras positivas se monitorea en tiempo real, esto permite a su vez la cuantificación del ácido nucleico.⁵³

Varios autores han reportado la detección de la envoltura viral como un método de diagnóstico temprano, sin embargo la baja sensibilidad obtenida principalmente en los pacientes con una infección secundaria no ha permitido su aplicación en la rutina diagnóstica.⁵⁴ La detección de la proteína NS1 pudiera convertirse en el método diagnóstico temprano de elección si se demuestran niveles de sensibilidad y especificidad adecuados, tanto en pacientes con una infección primaria como secundaria. Se ha demostrado la circulación en sangre de esta proteína desde etapas muy tempranas de la enfermedad lo que sugiere su posible aplicación en el diagnóstico. La NS1 además induce la formación de anticuerpos IgM e IgG cuya detección pudiera apoyar y completar el diagnóstico.⁵⁵

El diagnóstico del dengue es importante tanto para la identificación y manejo clínico de los enfermos como en la vigilancia epidemiológica. Hoy día, su principal aplicación es en la vigilancia establecida en los países endémicos o en riesgo de introducción de la enfermedad. La detección de anticuerpos IgM es la metodología de elección en la vigilancia serológica, que permite detectar temprano el incremento en la circulación viral en un área determinada. La vigilancia virológica y molecular permite identificar el(los) serotipo(s) y genotipo circulante.⁵

Aunque la PCR puede brindar un diagnóstico temprano, en la rutina diagnóstica, no cumple este objetivo. La no disponibilidad de este sistema en áreas endémicas o en los hospitales e instituciones de salud que reciben pacientes, unido a su costo, hace que todavía se necesiten sistemas que permitan un diagnóstico temprano durante la fase aguda de la enfermedad y que, a su vez, sean de manipulación sencilla y baratos.

Actualmente existen en el mercado más de 50 estuches comerciales sobre todo dirigidos al diagnóstico serológico. Estos utilizan diferentes formatos que permiten la detección de anticuerpos IgM e IgG.⁵⁶

En estos momentos el Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades

Tropicales (TDR), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Iniciativa para la Vacuna de Dengue Pediátrica (PDVI) están liderando un proyecto de evaluación de los estuches diagnósticos existentes. Laboratorios de las Américas y del Sudeste asiático han sido invitados a participar de esta investigación, la cual permitirá definir los mejores sistemas diagnósticos en términos de sensibilidad, especificidad y facilidad de ejecución.

EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

La incidencia de las epidemias de dengue se ha incrementado exponencialmente en los últimos 30 a 40 años. Aunque el peso real de la enfermedad no ha sido determinado, se estima que cada año ocurren entre 50 a 100 millones de casos, de ellos más de 500 000 de DH y que 2,5 billones de personas viven en áreas de riesgo de transmisión. La letalidad puede ser mayor que 5 %.²

El dengue es endémico en más de 100 países localizados en el Sudeste asiático, Pacífico occidental, Américas, África y el Medio Oriente. Durante las epidemias de dengue las tasas de ataque pueden ser tan elevadas como de 80 a 90 % en individuos susceptibles, la infección subclínica se observa en más de la mitad de los individuos infectados.⁵⁷

En la década de los 50 se reconoce a la FHD cuando se reportan las epidemias de una fiebre hemorrágica viral en Manila, Filipinas y en Tailandia. A partir de este momento la forma severa de la enfermedad se ha extendido primero a otros países del Sudeste asiático y posteriormente al Pacífico occidental y las Américas. Antes de 1970, solo 9 países habían reportado DH. En la actualidad más de 30 países lo reportan por lo que se considera un problema creciente de salud.⁵

Los factores involucrados en la emergencia del DH y la reemergencia del dengue son complejos y no bien estudiados, aunque posiblemente se relacionan a los profundos cambios demográficos y sociales ocurridos durante y después de la Segunda Guerra Mundial. Durante la guerra, tanto los virus como el vector se expandieron por varios países del Sudeste asiático. Más tarde, el crecimiento sin precedentes de la población, la urbanización masiva no planificada, el insuficiente abasto de

agua, el rápido y masivo movimiento de personal, el deterioro de los programas de control y de los sistemas de salud y la pobreza, han contribuido a la situación actual. La interacción del virus, el vector y el huésped son, en última instancia, los factores que determinan la dinámica de transmisión. La aparición de cepas de mayor virulencia y/o con mayor capacidad de transmisión así como la cocirculación de varios serotipos e incluso genotipos es también de importancia. Recién se ha demostrado la influencia de los cambios climáticos en la transmisión viral.⁵⁷⁻⁵⁹

El virus dengue se mantiene en la naturaleza en 2 ciclos de transmisión, el urbano (de mayor importancia epidemiológica) que involucra al hombre y al mosquito, como *Aedes aegypti* (su principal vector) y *Aedes albopictus* y el selvático, demostrado en Asia y en África, en el que participan mosquitos selváticos como *Aedes furcifer* y *Aedes luteocephalus* y primates no humanos.⁶⁰

El ciclo de transmisión peridoméstico, se favorece de la ecología de *Aedes aegypti*. La hembra del mosquito pone sus huevos en contenedores de agua limpia, vive junto al hombre y durante cada ciclo reproductivo puede alimentarse varias veces. El período de incubación extrínseca varía entre 7 a 10 d después de la infección, a partir de este momento permanece infectado de por vida y puede transmitir el virus a muchos individuos.

No hay dudas de la necesidad de una vacuna para dengue. Esta debe brindar inmunidad protectora de larga duración a los 4 serotipos del virus para evitar el fenómeno de inmunoamplificación viral. La ausencia de modelo animal que reproduzca la enfermedad, el incompleto conocimiento de su patogenia y el insuficiente financiamiento que han tenido las investigaciones en dengue, son varios de los retos que ha tenido el desarrollo de una vacuna.⁶¹

Entre las estrategias principales para lograrla se encuentran las vacunas convencionales de virus vivo atenuado y virus inactivado, la expresión de proteínas de interés por vía recombinante, las vacunas quiméricas basadas en la preparación de clones infecciosos y las vacunas de ADN.⁶¹ En estos momentos se cuenta con varios candidatos vacunales en diferentes etapas de su desarrollo clínico y preclínico.

Hasta tanto se cuente con una vacuna adecuada, el control del vector será la única forma de controlar la enfermedad.

ENFOQUES FUTUROS

El fenómeno desencadenado tras la infección por virus dengue es, como ya se refería, eminentemente un fenómeno inmunopatogénico. Para abordarlo deben ser integrados múltiples factores. El primero de estos factores tiene lugar una vez que se produce la picadura del mosquito: se propone hoy día que son las células dendríticas, monocitos y macrófagos las que principalmente soportan la infección viral, sin embargo; a) ¿cómo ocurre la diseminación viral y qué órganos o células contribuyen a la viremia? b) ¿son las células endoteliales infectadas *in vivo*? Son preguntas a responder en este contexto. Se conoce la importancia que reviste la respuesta de anticuerpos neutralizantes en la infección así como la respuesta de células T. Se proponen, incluso, modelos que tratan de explicar, a la luz de los conocimientos actuales, el fenómeno inmunopatogénico. Sin embargo existen lagunas que impiden determinar qué tipo de respuesta debe ser favorecida en la infección por virus dengue para evitar su progresión a FH y obtener un candidato vacunal efectivo. La virulencia de las diferentes cepas virales y su evolución son aspectos que deben ser definidos previo a la obtención de un posible inmunógeno.

Muchas interrogantes quedan para ser aclaradas en estudios futuros: a) ¿está el mayor o menor grado de virulencia de una cepa cuando es más citopática o cuando induce una mayor producción de citoquinas? b) ¿existe relación entre el grado de severidad y el tipo de cepa o serotipo? ¿cuál o cuáles son los receptores virales? ¿cuáles citoquinas están involucradas en el desarrollo del cuadro hemorrágico y cuáles vinculadas a la protección? ¿cuáles son los factores genéticos del individuo que determinan una susceptibilidad a sufrir la forma grave de esta enfermedad?

Las respuestas a todas estas interrogantes permitirán encausar el desarrollo de estrategias encaminadas a la atenuación del daño y a la protección.

Dengue and dengue hemorrhagic fever: a worldwide health problem

ABSTRACT

Since remote times as early as 1635 and 1699, dengue has been considered as the most important mosquito-borne viral disease. Given the significance of this disease worldwide, particularly in the Americas, it was necessary to look for an immediate solution to hinder the development of the most serious dengue variant. This study covered a review about some important aspects like clinical spectrum of the disease, the characteristics of the etiologic agent, and the immunopathogenic mechanisms that interact with the host.

Key words: Dengue, disease, pathogenesis, remission.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sotolongo F, Carlos J, Finlay. *Rev Cubana Med Trop*. 1973;25:7-20.
- Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *CIMID*. 2004;27:319-30.
- Monath TP. Yellow fever and dengue- the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Sem Virol*. 1994;5:133-45.
- Smith CEG. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg*. 1959;59:243-51.
- Pan American Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington, D.F.: PAHO; 1994. (Scientific Publication No. 548)
- Nimmannitya S. Clinical manifestations of dengue/dengue haemorrhagic fever. Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever. World Health Organization. Regional Office for South East Asia, New Delhi: Regional Publication, SEARO No. 22; 1993.
- Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:848-51.
- Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol*. 1997;148:273-7.
- Rigau JG. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. *Rev Panam Salud Publica*. 1997;1:381-8.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Inf Dis*. 1997;176:313-21.
- Chlebicki MP, Ang B, Barkham T, Laude A. Retinal haemorrhages in 4 patients with dengue fever. *E Inf Dis* 2005;11:770-2.
- Gonzalez D, Castro OE, Kouri G, Perez J, Martinez E, Vázquez S, et al. Classical dengue hemorrhagic fever from two dengue infections spaced 20 years or more apart. Havana, dengue 3 epidemic 2001-2002. *Int J Inf Dis*. 2005;9:280-5.
- Harris E, Videá E, Pérez E, Sandoval E, Téllez Y, Pérez M A. Clinical, epidemiologic and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63:5-11.
- Guzmán MG, Kourí G, Díaz M, Llop A, Vázquez S, González D, et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. *Expert Rev Vaccines* 2004;3:511-20.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus genome organization, maturation and fusion. *Cell*. 2002;108:717-25.
- Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, et al. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J Virol*. 2005;79:10278-88.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Warowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74:3227-34.
- Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:315-41.
- Leitmeyer K, Vaughn D, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999;73:4738-47.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*. 2005;79:853-9.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003;3:19-28.
- Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and haemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* 1989;11:5830-39.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology*. 1999;257:1-6.
- Chaturvedi UC, Agarwak R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;28:183-8.
- Monath TP. Flaviviruses. In: *Virology*. Fields BN editor. New York:Raven Press; 1996. p. 763-814.
- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observation related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovery. *Yale J Biol Med*. 1970;42:311-28.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:172-80.
- Guzmán MG, Kourí GP, Bravo J, Soler M, Vázquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba. A retrospective seroepidemiologic study *Am J Trop Med Hyg*. 1990;42:179-84.
- Halstead SD. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy*. 1982;31:202-9.
- Kurane I, Janus J, Ennis FA. Dengue virus infection of human skin fibroblasts *in vitro* production of IFN- β , IL-6 and GM-CSF. *Arch Virol*. 1992;124:21-30.
- Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:411-9.
- Kurane I, Meager A, Ennis FA. Dengue virus specific human T cell clones. Serotype cross reactive proliferation, Gamma interferon production and cytotoxic activity. *J Exp Med*. 1989;170:763-75.
- Kurane I, Ennis AF. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Sem Virol* 1994;5:443-8.
- Kurane I, Okamoto Y, Dai LC, Zeng LL, Brington MA, Ennis FA. Flavivirus -cross- reactive, HLA-DR-15- restricted epitope on NS3 recognized by human CD4+ CD8- cytotoxic T lymphocyte clones. *J Gen Virol*. 1995;76:2243-9.
- Mathew A, Kurane I, Rothman AL, Zeng LL, Brinton MA, Ennis FA. Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocyte of dengue virus nonstructural NS3 and NS1a. *J Clin Invest*. 1996;98:1684-894.

36. Kurane I, Innis BL, Nimmanitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infection. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991;88:1473-80.
37. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokines production by dengue virus-specific human cytotoxic T lymphocytes clones. *J Virology.* 1999;73:3623-9.
38. Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue 2 infections: deaths rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Pan Am J Public Health.* 2002;11:223-7.
39. Sierra B, García G, Pérez AB, Morier L, Rodríguez R, Alvarez M, et al. Long term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Inf Dis.* 2002;6:125-8.
40. Guzmán MG, Peláez O, Kouri G, Quintana I, Vázquez S, Pentón M, et al. Caracterización final y lecciones de la epidemia de dengue 3 en Cuba, 2001-2002. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19:282-9.
41. Halstead SB, Heinz FX, Barrett ADT, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* 2005;23:849-56.
42. Chungue E, Polil, Roche C, Gestas P, Glaziov P, Markoff JL. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Inf Dis.* 1994;170:1304-7.
43. Guzmán MG, Kouri G, Halstead S. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case fatality rates within epidemics?. *Lancet.* 2000;355:1902-3.
44. Bielefeldt-Ohmann H. The pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol.* 1997;5:409-13.
45. Sierra B, Pérez AB, García G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol.* 2007;68(6):531-40.
46. Kouri G, Guzmán MG, Bravo J. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? An integral analysis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:821-3.
47. Guzmán MG, Álvarez M, Vázquez S, Kouri G. Laboratory diagnosis of dengue infection: epidemiology and field studies. Dengue diagnostic: proceedings of an international workshop. ENICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and Training in Tropical Diseases (TDR), 4-6 October 2004. Geneva: WHO/TDR: 2005. (TDR/IRM/DIAG/DEN/05.1)
48. Vázquez S, Pérez AB, Ruiz D, Rodríguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005;33:132-7.
49. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Inf Dis.* 2004;8:69-80.
50. Vazquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis.* 2007;11(3):256-62.
51. Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3508-10.
52. Rosario D, Álvarez M, Díaz J, Contreras R, Vázquez S, Rodríguez R, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Pan Am J Public Health.* 1998;4:1-5.
53. Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. *J Virol Methods.* 2005;129:8-15.
54. Kittigul L, Meethien N, Sujirarat D, Kittigul C, Vasanavat S. Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. *Asian Pacific J Allergy Immunol.* 1997;15:187-91.
55. Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods.* 2007;140(1-2):75-9.
56. Mondesire RR. Commercial kits and reagents. Dengue diagnostic: proceedings of an international workshop. ENICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and Training in Tropical Diseases (TDR), 4-6 October 2004. Geneva: WHO/TDR: 2005. p. 30-31. (TDR/IRM/DIAG/DEN/05.1, 2005)
57. Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003;27:1-13.
58. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LT. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Med.* 2004;10:S98-A109.
59. Melzert MI, Rigau JG, Clark GG, Reiter P, Gubler DJ. Using disability adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984-1994. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:265-71.
60. Rudnick A. Ecology of dengue virus. *Asian J Infect Dis.* 1978;2:156-60.
61. Guzmán MG, Mune M, Kouri G. Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004;2:1-17.

Recibido: 6 de septiembre de 2007. Aprobado: 28 de octubre de 2007.
 Dra. *María G. Guzmán*. Departamento de Virología. Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" Autopista Novia del Mediodía, Km 6 ½, CP Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-2020450. Fax: 53-7-2046051. Correo electrónico: lupe@ipk.sld.cu