

Dengue y Dengue Hemorrágico, Cuba 1981-2005

Trabajo en Opción al grado de Doctor en Ciencias

***Autor: Dr. Ciencias Médicas, Prof. Maria G. Guzmán Tirado,
Especialista de 2do Grado en Microbiología***

***Departamento de Virología
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”***

Ciudad de la Habana, 2007

A nuestros niños fallecidos por Dengue Hemorrágico, 1981

Documentos presentados:

1. Resumen del trabajo
2. Resumen de *Currículum Vitae* de la Dr. en Ciencias Medicas, Prof. Maria G. Guzmán Tirado, Especialista de 2do Grado en Microbiología
3. Recopilación de publicaciones que integran el trabajo (documento anexo)
4. *Currículum Vitae* (documento anexo):
 - a) Resumen de *Currículum Vitae*
 - b) Listado de Publicaciones, capítulos de libros, patentes e informes de reuniones de expertos de dengue
 - c) Listado de comunicaciones y reportes cortos en el tema dengue
 - d) Listado de publicaciones en temas diferentes a dengue
 - e) Resultados relevantes, Logros de la ciencia, premios y reconocimientos
 - f) Cursos de postgrado y actividades docentes impartidas
 - g) Tutorías y asesoría de tesis
 - h) Otras actividades docentes
 - i) Comités de Expertos y Sociedades Científicas
 - j) Resumen de asesorías, congresos, cursos y otras actividades internacionales
 - k) Actividades de arbitraje de manuscritos sometidos a publicación y proyectos
 - l) Cursos recibidos, comités de expertos y sociedades científicas
 - m) Presentaciones en congresos y reuniones de expertos

Como documento para la defensa del grado de Doctor en Ciencias, se presenta la recopilación de las publicaciones de la autora en el tema de dengue durante el periodo 1979-2007 y su *currículum vitae* (CV). Con el ánimo de facilitar la comprensión y lectura de la obra, adjuntamos el presente resumen que incluye los principales resultados obtenidos.

Las publicaciones abordan como temáticas fundamentales: a) La caracterización de tres epidemias de dengue ocurridas en nuestro país en el periodo 1981-2002 así como los estudios clínico-epidemiológicos y virológicos con relación a las mismas b) Los estudios de factores de riesgo de desarrollo de la Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque del Dengue (FHD/SCD) c) La caracterización del agente etiológico aislado en dichas epidemias d) El desarrollo de métodos de diagnóstico e) Las actividades realizadas con relación a la vigilancia de laboratorio desarrollada en Cuba así como las actividades de referencia regional f) Las investigaciones encaminadas a la obtención de una vacuna cubana contra este agente.

Los resultados obtenidos se recopilan en más de 200 publicaciones científicas y reportes cortos así como en 79 tesis (diploma, maestría y doctorado). Estos estudios han dado lugar a 14 Logros Nacionales de la Ciencia en el tema dengue (en 4 de ellos autor principal), un premio CITMA a la investigación de mayor impacto social (segundo autor), varios premios provinciales y 5 nacionales en el Forum de Ciencia y Técnica (en 2 de ellos autor principal), 10 premios al Mejor Trabajo Científico del MINSAP a nivel central y nacional (4 de autor principal), numerosas presentaciones en congresos nacionales e internacionales a través de trabajos libres, mesas redondas y conferencias y a mas de 30 proyectos de investigación con financiamiento nacional y externo.

Entre otras actividades desarrolladas por la autora en estos años muy ligadas a la investigación científica, se destacan la docencia, las asesorías en Cuba y en el exterior y la participación en comités de expertos nacionales e internacionales así como la dirección científica del grupo de dengue y del proyecto nacional para la obtención de una vacuna cubana contra este agente. Así mismo, como responsable de la vigilancia de laboratorio de dengue en el IPK, ha participado activamente en el establecimiento de las pautas de la vigilancia a escala nacional.

Las investigaciones realizadas y dirigidas por ella, forman parte de varios proyectos de investigación nacionales e internacionales y han permitido la formación de un grupo de especialistas y particularmente de diplomantes, médicos microbiólogos, maestros en diferentes especialidades y doctores en ciencia.

Los resultados científicos, de importancia e impacto a escala nacional e internacional, han brindado nuevo conocimiento en el campo del dengue y han contribuido a elevar el reconocimiento mundial de los logros científicos de nuestro país.

Las actividades dirigidas por la autora han influido positivamente en la reciente nominación del Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector del cual es su directora y a la re-nominación por tercera vez del Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio de las Enfermedades Víricas del cual fue su directora hasta el año 2006.

Debe destacarse que la revista norteamericana *Science*, en el marco de las actividades por el 125 aniversario de la misma y con el objetivo de destacar el desarrollo de la ciencia a escala mundial, seleccionó en el año 2005 a la autora entre 12 científicos a escala mundial, para escribir y publicar su biografía científica.

Nota: En cada acápite de este resumen se citan algunas de las publicaciones donde estos resultados han sido reportados.

1. Actualización del tema

La Fiebre del Dengue (FD) y su forma severa, la Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque del Dengue (FHD/SCD) constituye un problema creciente de salud en el mundo tropical y subtropical. El dengue se ha reconocido en más de 100 países. Se estima que anualmente se producen entre 50-100 millones de casos de FD y varios miles de casos de FHD/SCD. La enfermedad es endémica en las Américas, Sudeste Asiático, Pacífico Occidental y África (1-4).

El incremento en la densidad y distribución geográfica del vector y en la transmisión del agente son los factores directamente responsables de la emergencia y re-emergencia de la entidad. El crecimiento sin precedentes de la población, la urbanización no planificada, el inadecuado e insuficiente suministro de agua, el deterioro de los sistemas de salud y de los programas de control del vector unidos a los cambios climáticos y la variación genética del agente son factores de gran importancia en la emergencia del dengue (5-13).

El dengue se transmite al hombre a través de la picada del mosquito *Aedes aegypti*. Cuatro virus, los serotipos dengue 1, 2, 3 y 4 (Den 1-4), clasificados en un complejo antigénico del género flavivirus de la familia flaviviridae son los agentes etiológicos de esta enfermedad. Estos agentes, de 40-50 nm de diámetro tienen una envoltura lipídica y están constituidos por una cadena simple de ARN de polaridad positiva el cual codifica para tres proteínas estructurales (cápside, C, membrana, M, y envoltura, E) y para 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (14-16).

La mayoría de las infecciones son asintomáticas o con manifestaciones clínicas muy ligeras caracterizadas por fiebre indiferenciada con o sin erupción principalmente en niños y menores de un año. Los niños mayorcitos y los adultos pueden desarrollar una enfermedad febril ligera o el cuadro típico de la FD caracterizada por fiebre elevada, cefalea severa,

mialgia, artralgia, dolor retro-orbital y erupción maculopapular. Algunos pacientes muestran petequias, equimosis o una prueba del torniquete positiva. En algunos casos puede observarse trombocitopenia (17-22).

La extravasación de líquido es el hecho patofisiológico principal de la FHD/SCD y lo diferencia de la FD. La FHD/SCD se caracteriza por fiebre elevada, sangramientos, trombocitopenia con menos de 100,000 plaquetas/ml y hemoconcentración (incremento del hematocrito en más del 20%). Después de 3-4 días de comienzo de la fiebre pueden observarse petequias, equimosis, epistaxis, hemorragia gingival y gastrointestinal. Son comunes la efusión pleural, ascitis e hiponatremia. Algunos pacientes evolucionan al fallo circulatorio (choque por dengue) presentando pulso débil y rápido, estrechamiento de la presión del pulso o hipotensión, piel fría y sudorosa y estado mental alterado (17,22). Aunque no hay un tratamiento antiviral específico, los pacientes usualmente se recuperan después de una terapéutica de soporte temprana con fluidos y electrolitos.

Una vez que un individuo es infectado, se produce un periodo de incubación intrínseca de aproximadamente 7-10 días. El virus está presente en la sangre dos a tres días antes del comienzo de la fiebre hasta 5-6 días después. En este periodo, puede realizarse el aislamiento viral utilizando cultivos celulares de células de mosquito *Aedes albopictus* (C636) o *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) los cuales se inoculan con el suero del paciente. La técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo permite la identificación viral (23,24). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y más recientemente la RCP en tiempo real, permiten la detección del genoma viral, su identificación en serotipos y cuantificación en suero, tejidos, larvas, mosquitos adultos o sobrenadante de cultivos celulares infectados (23-28).

Para el diagnóstico serológico se emplean principalmente los métodos inmunoenzimáticos que permiten la detección de anticuerpos IgM e IgG antidengue. La detección de anticuerpos IgM antidengue (sugestivos de una infección reciente), la detección de niveles elevados de inmunoglobulinas totales o de anticuerpos IgG en monoseros y la seroconversión o incremento en 4 veces o más del título de anticuerpos IgG antidengue en sueros pareados permiten el diagnóstico serológico del dengue (23,24,29).

El dengue hemorrágico (DH) ocurre como consecuencia de un mecanismo complejo donde el virus, el hombre y su respuesta inmune interactúan conduciendo a la enfermedad severa en un 2-4% de los individuos con una infección secundaria. Las personas infectadas con un serotipo mantienen una inmunidad protectora casi de por vida a la infección con el virus homólogo, pero la inmunidad heteróloga es de corta duración (30). Se ha propuesto que los anticuerpos neutralizantes modulan la severidad de la enfermedad. Durante una segunda infección con un serotipo diferente, la presencia de bajas cantidades de anticuerpos neutralizantes heterotípicos pudiera modular la infección y prevenir la forma severa de la enfermedad, por el contrario cuando no están presentes los anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos heterólogos no neutralizantes forman inmunocomplejos con el virus los cuales infectan células fagocíticas con una eficiencia elevada y consecuentemente un mayor número de células se infectan (fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos, ADA) (1,31-35). La respuesta de células T parece también jugar un papel importante. Se ha demostrado que después de una infección por dengue se producen linfocitos T de memoria serotipo-específico y serotipo-cruzado y se hipotetiza que durante una infección secundaria, se produce una activación de células T en su interacción con los monocitos infectados. Observaciones recientes indican que en el curso del dengue hemorrágico, se produce una activación masiva de las células T, fenómeno que pudiera explicar total o parcialmente el

mecanismo de aumento de la permeabilidad vascular y los trastornos de la coagulación debido a la liberación de citoquinas y mediadores químicos por la activación de células T y los monocitos infectados. Este fenómeno podría explicar la presencia de choque y el sangramiento en el curso de la enfermedad (36-41). Varios autores han planteado que la transición de una respuesta celular de tipo TH1 a TH2 caracteriza la forma severa de la enfermedad (42). Recientemente se ha observado la producción de células T con una afinidad baja frente al segundo virus infectante y una afinidad más elevada hacia el serotipo que produjo la infección primaria. Este fenómeno pudiera ser consecuencia del fenómeno del pecado original. Sin embargo, como explicación alternativa, se ha propuesto que la elevada carga antigénica asociada con el fenómeno de la inmunoamplificación en el curso de una segunda infección viral puede conducir a las células T de elevada afinidad a la apoptosis, lo que aumentaría la frecuencia de células de baja afinidad (43). Una respuesta inapropiada de las células T pudiera contribuir a la inmunopatología, conduciendo a una baja eliminación del virus.

Existen evidencias de que en este proceso se produce una activación masiva del complemento, mecanismo que pudiera explicar la salida de plasma y el desarrollo de las manifestaciones hemorrágicas (38-41,44). Es probable que el sistema del complemento se active a través de los inmuno-complejos virus-anticuerpo y/o a través de varias citoquinas, conduciendo a la liberación de C3a y C5a, que tienen efectos directos en el incremento de la permeabilidad vascular.

Evidencias actuales sugieren que auto-anticuerpos dirigidos contra las proteínas E y NS1 virales pudieran resultar en una disfunción de las plaquetas y las células endoteliales favoreciendo la trombocitopenia, el sangramiento y el incremento en la permeabilidad vascular y de ahí la severidad de la enfermedad (40, 45).

El avance del conocimiento mundial y el acceso a las nuevas tecnologías, están permitiendo profundizar mas en los mecanismos moleculares que se desarrollan en los primeros momentos de la infección, a partir de la inoculación del virus por el mosquito. Aparentemente el virus inoculado interactúa inicialmente con las células dendríticas de la piel las que procesan el antígeno y lo presentan a las células T para el desarrollo posterior de la inmunidad adaptativa. En este contexto el papel de la inmunidad innata en general y particularmente de las células dendríticas, las células NK (Natural Killer del inglés) y el sistema del interferón parecen jugar un papel definitivo en la infección y de su resultado final (infección asintomática, la FD o la FHD/SCD). Reportes recientes confirman que el virus a través de al menos dos de sus proteínas no estructurales (NS2a y NS4b), puede bloquear el estado antiviral producido por los interferones alfa y beta como una estrategia viral de evasión al sistema inmune (46-48).

En el desarrollo del cuadro severo de la enfermedad, las características del virus también son de importancia (49,50). Se han reportado cepas de dengue y particularmente genotipos con potencial para causar FHD. Leitmeyer y cols. sugirieron que las cepas de Den 2, pertenecientes al genotipo asiático, están asociadas al desarrollo de la enfermedad severa a diferencia de las cepas de este mismo serotipo pertenecientes al genotipo americano (51). Este grupo ha identificado mutaciones en el genoma del dengue que están asociadas a los cambios en la virulencia. Más recientemente, se ha observado que las cepas de virus Den 2 del genotipo americano muestran una capacidad de replicación disminuida en macrófagos y células dendríticas humanas así como una capacidad disminuida de infectar y diseminarse en mosquitos *Aedes aegypti* (52-54).

La prevención de la enfermedad depende del control del vector debido a que no existe en la actualidad una vacuna disponible (1). Una vacuna debe brindar inmunidad protectora de

larga duración frente a los cuatro serotipos del virus para evitar el fenómeno de ADA. La ausencia de un modelo animal, el pobre conocimiento de la patogenia de la enfermedad y el escaso financiamiento para las investigaciones son factores que han influido negativamente en el desarrollo de una vacuna contra el dengue (55-59).

Actualmente existen varios candidatos vacunales en fase preclínica y clínica. Los mismos siguen las siguientes estrategias: a) vacunas atenuadas por vía convencional b) vacunas quiméricas c) vacunas recombinantes de subunidad expresadas en levadura, *E. Coli*, baculovirus y vaccinia d) vacunas de ADN. La vacunas tetravalente viva atenuadas desarrolladas por la Universidad de Tailandia (licenciada por Sanofi Pasteur) y por el Instituto de Investigación del Ejercito Walter Reed, WRAIR (licenciada por Glaxo Smith Kline, GSK) y la vacuna quimérica de Fiebre amarilla/dengue desarrollada por Acambis/Sanofi Pasteur son posiblemente las que se encuentran en etapas más avanzadas de desarrollo. Las primeras se encuentran en fase I y II y la segunda se encuentra en fase II (55-59). Recientemente ha surgido “La Iniciativa de la Vacuna de Dengue para la Infancia” (PDVI, del inglés, Pediatric Dengue Vaccine Initiative) con el objetivo de buscar fondos que permitan agilizar las investigaciones y acortar el intervalo de desarrollo y aplicación de una vacuna segura para la infancia (60).

Hasta tanto se cuente con una vacuna segura, el control del vector será la única forma de disminuir la transmisión del dengue. La vigilancia integrada (vigilancia ambiental, vectorial, clínico epidemiológica con soporte de laboratorio) unido a una estrategia de control del vector donde la participación de la comunidad y la participación intersectorial son cruciales, es la estrategia actual propuesta por las principales organizaciones internacionales para lograr el control efectivo del dengue (61-68).

La situación actual del dengue en la región de las Américas recuerda a la del sudeste Asiático. Durante las últimas tres décadas del siglo XX, se observó un incremento en la densidad del vector, la co-circulación de varios serotipos, la endemidad por FHD en muchos países y el incremento de la actividad de dengue. La región de las Américas evolucionó de una situación no endémica o hipoendémica a la hiperendemicidad. De un patrón caracterizado por epidemias a intervalos largos y circulación transitoria del virus evolucionó a un patrón caracterizado por epidemias anuales en diferentes localidades y co-circulación viral (1,69-71). Entre los eventos de mayor importancia ocurridos en la región de las Américas en esta etapa se destacan la pandemia de Den 1 en 1977, el último aislamiento del virus Den 3 en 1977-1978 y su reintroducción en 1994 después de 17 años de ausencia, la primera epidemia de FHD/SCD ocurrida en Cuba en el año 1981, la introducción del serotipo 4 en la región en ese mismo año, la introducción del mosquito *Aedes albopictus* en 1985, la segunda epidemia de FHD ocurrida en Venezuela en 1989 y la expansión del mosquito *Aedes aegypti* acompañado de la hiperendemicidad viral con co-circulación de múltiples virus y endemidad de la FHD (72-79).

En el 2002 (año de mayor número de reporte de casos en la región de las Américas), se notificaron 1 019 196 enfermos con mas de 14 000 casos de FHD/SCD y 225 fallecidos. Estas cifras, las mayores reportadas en esta región, representan un incremento de 282 210 casos de FD y 5012 de FHD cuando se comparan al año 1998, año con las mayores cifras reportadas con anterioridad. La relación FHD/FD se incrementó de 0.9 en 1980 a 20.4 en el año 2000 (1, 69). Finalmente en el periodo 2001-2005 se reportaron aproximadamente 2 879 926 casos clínicos de dengue con 65 235 casos de FHD y 789 fallecidos. Más de 30 países reportaron actividad de dengue y varios co-circulación de varios serotipos (80).

2. Descripción y estudio de las epidemias de Dengue y Dengue Hemorrágico ocurridas en Cuba en el periodo 1981-2002

En nuestro país existen reportes de varias epidemias tipo dengue en el siglo XIX (81-83). En 1945, se notificó un brote en la Habana no reportándose de nuevo la enfermedad clínica hasta el año 1977 cuando se produce una epidemia de FD causada por el virus Den 1 durante la cual se documentó casi medio millón de enfermos de todo el país. Estudios sero-epidemiológicos realizados con anterioridad (1975) y posterioridad (1978) a esta epidemia, mostraron que de una cifra de 2.6% personas inmunes a dengue en 1975, se pasó a una cifra de 44.46% lo que evidenció la elevada circulación de este virus en los años 1977 y 1978 (84,85).

En el periodo de 1981 a 2002 han ocurrido tres epidemias de dengue hemorrágico. La epidemia de 1981 durante la cual se reportaron 344 303 casos, de ellos 10 312 graves y muy graves y 158 fallecidos (101 niños y 57 adultos), la epidemia de Santiago de Cuba en 1997 con 3 012 casos confirmados serológicamente, 205 pacientes (todos adultos) clasificados como FHD/SCD de ellos 12 fallecidos y la de 2001-2002 con 14 443 casos confirmados (de ellos, 12 889 en Ciudad de la Habana), 81 de FHD/SCD y 3 fallecidos (86-92).

Los estudios realizados en estas tres situaciones permitieron:

1. Identificar como virus Den 2 al agente etiológico de la epidemia de 1981. El aislamiento de este virus en muestras de casos clínicamente sospechosos de FHD y en vísceras de fallecidos permitieron confirmar que estábamos en presencia de una epidemia de DH, la primera ocurrida en nuestra región.
2. Confirmar, la presencia de virus Den 2 en el municipio de Santiago de Cuba, después de 16 años sin circulación de dengue en Cuba.

3. Detección temprana de la transmisión de virus Den 2 (1997) y virus Den 3 (2001-2002) y alerta a las autoridades de salud.
4. Identificar la entrada de un nuevo serotipo (Den 3) para el cual toda la población cubana era susceptible (epidemia de 2001-2002)
5. Descripción del cuadro clínico de la enfermedad en pacientes de FD y FHD con un diagnóstico confirmado de dengue.
6. Confirmar la transmisión viral en nuevas zonas del país durante las epidemias de 1981 y 2001-2002 y la no extensión del dengue fuera del municipio de Santiago de Cuba durante la epidemia de 1997.
7. Confirmar el cese de la transmisión en cada una de estas situaciones epidemiológicas.
8. Establecimiento de los criterios de casos y de las pautas de la vigilancia de laboratorio en cada etapa.
9. Aislamiento de un número de cepas virales (de casos de FD y FHD y colectadas en varios momentos en el transcurso de las epidemias) necesarias para estudios posteriores.

3. Datos de interés en cuanto a la clínica del Dengue Hemorrágico en Cuba.

Tres hechos novedosos han acompañado al DH en Cuba:

1. La epidemia de 1981, representó un hecho nuevo en la historia del dengue en la región de las Américas y del mundo. Con anterioridad, la FHD/SCD sólo se había reportado en forma epidémica en el sudeste Asiático y el Pacífico Occidental y principalmente en niños. En nuestra región antes de 1981, sólo 60 casos se habían notificado, la mayoría sin confirmación de laboratorio. Es en la epidemia cubana de 1981 donde se demuestra por primera vez la forma severa de la enfermedad en un

área geográfica diferente a las endémicas (sudeste Asiático y el Pacífico Occidental) y donde a su vez se demuestra por primera vez el DH en forma epidémica en el adulto (1,4,17,69,71,91,93,94).

2. La epidemia de 1997, demuestra también por primera vez otro hecho novedoso: la presencia de casos de FHD/SCD en adultos que sufren su segunda infección por dengue después de casi 20 años de la infección primaria. Este hecho añade una nueva dimensión al problema ya que hasta ese momento se consideraba que el riesgo de desarrollo de DH se enmarcaba en los primeros 5-6 años después de la infección primaria por dengue (90,91,95-97).
3. La epidemia del 2001-2002 también presenta otro hecho novedoso: por primera vez se observa la transmisión de Den 3 en nuestro país y se demuestra también que es posible que se produzcan casos de FHD/SCD (de nuevo en adultos) secundariamente infectados por el virus Den 3 después de 20 a 24 años de la infección primaria (Den 1 o Den 2). Aún más, se demuestra la presencia por primera vez de casos de FHD/SCD en pacientes que sufren una infección terciaria por dengue. Hasta ese momento se consideraba que una tercera infección conducía en la mayoría de los casos a infecciones inaparentes o muy ligeras (4,87,95,98).

Estos tres hechos, hacen que la descripción de los aspectos clínicos observados en los pacientes de FHD/SCD sea de gran interés, primero para determinar si el cuadro clínico observado en los niños con FHD/SCD en Cuba en 1981 era similar al reportado en las áreas endémicas hasta aquel momento y segundo para describir por primera vez el cuadro clínico del DH en el adulto y comparar el mismo en individuos con una infección secundaria ocurrida a diferentes intervalos de la infección primaria e incluso producida por diferentes serotipos virales.

Con tal fin se estudiaron varios grupos de pacientes (niños y adultos) con un diagnóstico clínico de FHD/SCD (de evolución satisfactoria y fallecidos) procedentes de las tres epidemias. La presencia de anticuerpos neutralizantes a virus Den 2 en los pacientes de evolución satisfactoria de la epidemia de 1981, el aislamiento viral y detección de antígeno de virus Den 2 o su ácido nucleico en muestras de tejidos en el 34.7% de 23 fallecidos en 1981 y la detección de los anticuerpos IgM a dengue en sueros colectados en los primeros 5-6 días de la fiebre en los pacientes de las epidemias de 1997 y 2001-2002 permitió confirmar el diagnóstico clínico en los mismos. La infección secundaria se confirmó en la mayoría de los casos estudiados (4,86,88,89,95,97-105). La tabla 1 resume algunos de los principales hallazgos clínicos reportados en los pacientes estudiados.

Tabla 1. Algunos hallazgos clínicos (expresados en porcentajes) observados en pacientes cubanos con FHD/SCD, epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002.

Epidemias	1981				1997		2001-2002
	Niños		Adultos		Adultos		Adultos
	FHD/SCD n=124	Fallecidos n=72	FHD/SCD n =104	Fallecidos n=26	FHD/SCD n=205	Fallecidos n=12	FHD/SCD n=76*
Hepatomegalia	67	78	11	35	51.2	66.6	1.8***
Dolor abdominal	63	57	23	58	86	83.3	48.6
Ascitis	31	10	0	8	68.7	91.6	1.8***
Derrame pleural	56	31	2.8**	8	30.2	58.3	20.3***
Choque	100	100	0	100	15.1	100	23.6
Hematemesis	30	60	14	35	14	58.3	14.4

*Incluye dos fallecidos. **Observada mediante estudio radiológico. ***Observado mediante estudio ultrasonográfico

En cuanto al DH en el adulto, el mismo se observó en forma epidémica por primera vez durante la epidemia de 1981. Posteriormente, se han reportado casos en varios países de la región americana y un incremento en el sudeste Asiático. Los vómitos y el dolor abdominal

fueron signos de mal pronóstico. El choque en 1981 se observó menos frecuentemente en el adulto que en el niño y constituyó un signo de mal pronóstico. A diferencia de los niños, en que el choque fue reversible, en el adulto, cuando se producía generalmente era irreversible (17,100-103,106).

La epidemia de 1981 permitió comparar la gravedad del cuadro en niños y adultos procedentes de una misma población, infectados durante la misma epidemia con el mismo serotipo viral (Den 2) y con antecedentes de infección previa por la misma cepa de virus Den 1 en el mismo momento y lugar geográfico. Para hacer esta comparación de gravedad del cuadro de FHD/SCD se pueden considerar varios parámetros como total de fallecidos en niños y adultos durante la epidemia y presencia de algunos parámetros de gravedad como hepatomegalia, sangramiento mayor como hematemesis, presencia de choque, dolor abdominal, ascitis y derrame pleural entre otros. Durante la epidemia de 1981 se observaron 158 fallecidos de los que 101 fueron niños y 57 adultos. Dadas las características del sistema de salud cubano y las acciones tomadas durante la epidemia, consideramos que en general, una vez conocida la presencia de la misma, todos los pacientes tuvieron la misma oportunidad de recibir un tratamiento adecuado por lo que la mayor cifra de fallecidos en los niños sugiere una mayor severidad para este grupo de edad. Es llamativo también, el mayor porcentaje de hepatomegalia, ascitis, hidrotórax, hematemesis y choque observados en los niños (tanto los que evolucionaron favorablemente como los fallecidos) cuando se comparan a los adultos con un diagnóstico similar procedentes de la misma epidemia (Tabla 1). En las áreas endémicas de DH la forma grave de la enfermedad se observa predominantemente en la población infantil, además se ha reportado una mayor capacidad de desarrollo de permeabilidad vascular en los niños (107).

Los pacientes de DH adultos reportados durante las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002 tienen como base que proceden de la misma población y como antecedente previo una infección primaria por virus Den 1 en el año 1977, siendo diferente el momento de la segunda infección y el serotipo de esta (Den 2 en 1981 y 1997 y Den 3 en el 2001-2002).

Si en forma similar a como realizamos previamente, comparamos los datos para los adultos con un diagnóstico clínico de DH en las epidemias de 1981 y 1997 observamos una mayor gravedad del cuadro clínico en los pacientes de la epidemia de 1997 (porcentajes mas elevados de hepatomegalia, dolor abdominal, ascitis, derrame pleural y hematemesis). Es de señalar que aunque las cepas de virus Den 2 fueron diferentes en las epidemias de 1981 y 1997, ambas pertenecen al genotipo Asiático con potencial para desarrollar epidemias de DH. Con relación a la epidemia de 2001-2002, los datos sugieren una severidad intermedia y en algunos casos menor de los enfermos cuando se compara a las epidemias de 1981 y 1997. Esto pudiera deberse al serotipo causante de la infección, a las secuencias de infección y al intervalo entre las mismas. En estos momentos estamos desarrollando estudios con relación a este aspecto.

En la tabla 2 se presentan los datos principales relativos a las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002 y se incluyen las cifras reportadas durante la epidemia de Den 1 de 1977. Fue muy llamativo observar que a diferencia de las cifras de morbilidad que son mayores en la epidemia de 1981, las cifras de mortalidad y letalidad son mayores en las epidemias ocurridas 20 o mas años después de la epidemia de 1977 (86,93).

Tabla 2. Datos de interés con relación a las epidemias cubanas de 1977, 1981, 1997 y 2001-2002

	Cuba, 1977	Cuba, 1981	Santiago de Cuba, 1997*	C. Habana, 2001-2002*
Total de casos reportados	553 138	344 203	3 012	12 889
Casos de FHD/SCD	no	10 312	205**	78**
Total de fallecidos	no	158	12**	3**
Morbilidad (x 10 000)	553.1	334.2	63.3	59.2
Mortalidad (x 100 000)	-	1.58	2.5	0.13
Letalidad (x 100 FHD/SCD)	-	1.53	5.8	3.8
Serotipo viral	Den 1	Den 2	Den 2	Den 3
Genotipo	Americano	Asiático	Asiático	Asiático
Población en riesgo de infección secundaria	no	44.46%	18.5%	32.1%
Intervalo de infección (años)	-	4	16-20	21-25

*casos confirmados serológicamente; **adultos

4. Factores Asociados al desarrollo de Dengue Hemorrágico. Experiencia Cubana

La situación epidemiológica de dengue en Cuba con varias epidemias producidas por un serotipo y sin endemidad posterior ha permitido estudiar varios factores asociados al

desarrollo de DH en tres contextos diferentes, la epidemia de 1981, la de 1997 y la del 2001-2002.

4. 1. Factores dependientes del individuo.

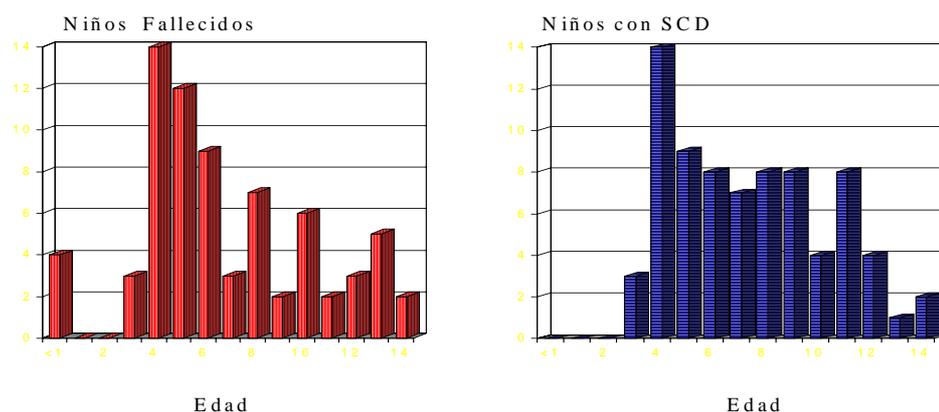
4.1.1 Infección secundaria por un serotipo diferente al causante de la primoinfección.

En las tres epidemias cubanas se demuestra sin lugar a dudas el papel importante de la infección secundaria (IS) en el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. La epidemia de Den 1 del año 1977, durante la cual se infectó el 44.46% de la población (casi la mitad de la población en aquel momento) preparó a la misma y la sensibilizó para el desarrollo de una infección secundaria, de producirse futuras transmisiones de dengue. Con anterioridad a esta epidemia, sólo el 2.6% de la población era inmune a dengue estando limitado a individuos mayores nacidos durante brotes de dengue ocurridos en 1945 o antes (84,85).

Dos observaciones epidemiológicas de gran importancia han sido realizadas en las tres epidemias, las cuales apoyan el papel de la IS como factor de riesgo de DH: La no observación de niños de 1 y 2 años de edad con FHD/SCD durante la epidemia de 1981, posiblemente debido a que no estaban nacidos durante la epidemia de 1977 y por ende no eran susceptibles de desarrollar una IS por el virus Den 2 y la observación de casos de DH sólo en adultos durante las epidemias de 1997 y 2001-2002 y no en niños (estos sufrían por primera vez su infección primaria por dengue) (figura 1). Estas observaciones epidemiológicas sugieren el papel de la IS como factor de riesgo de DH. Por otra parte, los resultados de los estudios clínico-seroepidemiológicos realizados en las tres epidemias confirman en el contexto de una situación epidemiológica muy bien definida el papel importante de la IS. En la tabla 3 se presentan los porcentajes de IS en varios grupos de pacientes con FHD/SCD estudiados durante las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002.

Como puede observarse, los porcentajes fluctuaron en su mayoría entre 97-98% en las tres epidemias. Es de señalar que en uno de los 12 fallecidos por DH de la epidemia de Santiago de Cuba de 1997 no pudo determinarse con certeza si el paciente desarrolló una IS por lo que se asumió como primaria ya que el nivel de anticuerpos IgG en el suero colectado al quinto día de la enfermedad (1/320) no permitió su clara definición (86,89,95-99,101-106,108,109). Estudios recientes de nuestro grupo sugieren que este título de anticuerpos al 5to día de la enfermedad es sugestivo de una infección secundaria (Vázquez S, comunicación personal).

Figura 1. Distribución por edad de niños con SCD y fallecidos, 1981



Fuente: Guzman y cols, *Bull Pan Am Health Org*, 1987
 Bravo y cols., *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987

Finalmente, otra observación epidemiológica que indirectamente apoya el papel de la IS como factor de riesgo de DH es la ausencia de casos graves durante la epidemia de Den 1 de 1977, a pesar de la amplia circulación viral (casi la mitad de la población se infectó por primera vez con este agente) y del elevado reporte de casos clínicos. En el momento en que esta epidemia se produce, la población cubana en su mayoría estaba en riesgo de desarrollar una infección primaria por dengue.

Tabla 3. Porcentaje de Infección Secundaria por dengue en pacientes con un diagnóstico clínico de FHD/SCD*

Epidemias	1981		1997		2001-2002
	Niños	Adultos	Adultos		Adultos
	FHD/SCD**		FHD/SCD	Fallecidos	FHD/SCD
Nº pacientes estudiados	124	104	111	12	54
% Infección secundaria	98.5	98	98	91.6	94.5

* Estudios serológicos realizados mediante ELISA de Inhibición y ensayos de NPRP;

**Casos de FHD/SCD de evolución satisfactoria.

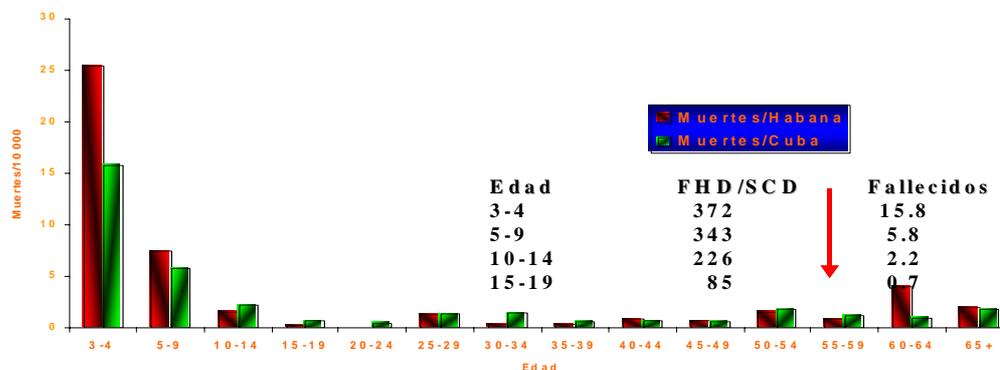
No existen reportes clínicos de DH asociados a la infección secuencial por un tercer o cuarto serotipo del dengue, lo que ha sugerido que las infecciones por varios serotipos inducen una protección cruzada que modula la gravedad de la infección. La epidemia de 2001-2002 brindó una oportunidad para estudiar la relación de la infección terciaria por dengue con el DH. Durante la misma era de esperar que un elevado número de individuos desarrollara su infección terciaria. En 10 pacientes con un cuadro clínico confirmado de FHD/SCD durante la epidemia, se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes a los serotipos Den 1, Den 2 y Den 3 (99). En el contexto de la situación epidemiológica cubana, estos resultados serológicos sugieren que estos individuos desarrollaron su infección primaria por Den 1 en 1977, su IS por Den 2 en 1981 (todos los individuos provienen de

Ciudad Habana) y su infección terciaria por Den 3, 24-25 años después de la infección inicial. El reconocimiento del DH en el curso de una infección terciaria representa un nuevo reto para los estudios de patogenia y de vacunas.

Dos aspectos de interés se derivan del estudio de la IS como factor de riesgo de FHD/SCD en nuestro país: la edad como factor de riesgo de DH y el intervalo entre las infecciones (primaria y secundaria) (96,110). También de interés es la secuencia de infección causante de DH. En nuestras condiciones, las secuencias de infección Den 1 seguida por Den 2 y Den 1 seguida por Den 3 fueron capaces de inducir el desarrollo de DH. Durante la epidemia de 2001-2002, de las dos secuencias de infección posibles (Den1/Den3 y Den2/Den3), solo la secuencia Den1/Den3 se asoció al cuadro severo de la enfermedad a pesar de que mediante ensayos de neutralización pudo demostrarse que en individuos con una infección asintomática y en casos de FD la secuencia Den2/Den3 estuvo presente (99).

El estudio de las edades de los casos hospitalizados por DH y de los fallecidos por cada 10 000 IS para la Habana y para todo el país durante la epidemia de 1981, permitió estimar por primera vez las tasas de casos de DH según IS y grupo de edad y comprobar la mayor severidad de la enfermedad en las edades tempranas de la vida lo que está acorde con las observaciones epidemiológicas de la mayor frecuencia del cuadro grave de la enfermedad en el niño (110). En la figura 2 se presentan las tasas estimadas de fallecidos por DH para el país y la Habana según IS. Como puede observarse, los niños de 3-4 años mostraron las tasas de letalidad mas elevadas (35/10 000), casi tres veces mas elevada que los niños de 5-9 años y casi 5 veces mas elevada que los niños de 10-14 años. Estos datos sugieren que la edad fue una variable de gran importancia en el resultado clínico de la IS por el virus Den 2 observándose como la severidad de la infección en el transcurso de una IS por este virus disminuyó a medida que la edad avanzaba.

Figura 2. Tasa de Fallecidos de FHD/SCD por edad por cada 10⁴ Infecciones Secundarias por Den 2



Fuente: Guzman y cols., *Int Inf Dis* 2002

Finalmente, estas observaciones sugieren que existe una poderosa asociación entre la edad y el riesgo de morir por incremento en la permeabilidad vascular durante una IS y que aunque el DH ocurre en el adulto, este se produce con una frecuencia considerablemente menor comparada a la de los niños. Además, como se mencionó anteriormente, fue llamativa la mayor severidad de la enfermedad en el niño cuando se comparaba al adulto si medimos la misma en términos de porcentaje de enfermos que presentaron hepatomegalia, hematemesis, ascitis y derrame pleural observado en los pacientes (Tabla 1).

La epidemia de Den 2 de 1997 permitió demostrar por primera vez la importancia del intervalo entre las infecciones (primaria y secundaria) como factor de riesgo de desarrollo de DH (96). Estudios previos sugerían que el DH se producía sólo si las infecciones primaria y secundaria ocurrían en un intervalo de 5 años o menos (111). La epidemia de Den 2 de Santiago de Cuba de 1997 y posteriormente la de Den 3 de 2001-2002 permitieron demostrar la influencia del intervalo entre ambas infecciones como factor de riesgo de DH. Particularmente durante la epidemia de 1997, se estimaron las tasas de casos

hospitalizados de FHD/SCD y de fallecidos por cada 10 000 IS por virus Den 2 y se compararon con las observadas durante la epidemia de 1981 para los mismos grupos de edad. Para los adultos de 15-39 años de edad las tasas de fallecidos por 10 000 IS por virus Den 2 fueron 38.5 veces más elevadas para Santiago de Cuba (1997) que para la Habana (1981) (96).

Estos resultados sugieren que aparentemente no existe un límite en la sensibilización después de una infección primaria. Aunque no podemos descartar que la cepa de Den 2 aislada durante la epidemia de 1997 sea de mayor virulencia que la aislada en 1981, no consideramos que esta sea la causa principal de la mayor severidad observada durante la epidemia de 1997 ya que ambas cepas pertenecen al genotipo asiático el cual se ha asociado a epidemias de DH y ambas cepas muestran en su envoltura cambios aminoacídicos considerados como de importancia para la virulencia. Quizás cambios en la avidéz de los anticuerpos en el tiempo puedan estar relacionados a la mayor severidad de las IS por Den 2. El incremento en la avidéz de los anticuerpos en el tiempo pudiera acompañarse de una disminución de la actividad neutralizante heterotípica dirigida a sitios neutralizantes heterólogos. Si estos sitios no son neutralizados durante una segunda infección, el fenómeno de la immunoamplificación podría desarrollarse.

Para profundizar en este fenómeno, se estudiaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de individuos inmunes a Den 1 colectados 4-8 años y 20-22 años después de la infección. Este estudio permitió conocer como los anticuerpos neutralizantes homólogos a Den 1 y heterólogos a los restantes serotipos evolucionan en el tiempo. En el estudio se incluyeron dos cepas de virus Den 2 (una de genotipo asiático y otra de genotipo americano). La investigación permitió conocer que los anticuerpos neutralizantes homotípicos a Den 1 se incrementaron en al menos 1.5 veces después de 20 años de la

infección sugiriendo que con el tiempo los sueros se vuelven más monotípicos y pierden la actividad neutralizante heterotípica. Los resultados mostraron además un bajo nivel de neutralización heterotípica al virus Den 2 genotipo asiático; por su parte, el virus Den 2 genotipo americano fue neutralizado en forma más efectiva que el genotipo asiático, sin embargo, se observó una disminución de esta reactividad en el tiempo (Tabla 4). El incremento de la actividad neutralizante homotípica y disminución de la heterotípica en el tiempo fue consistente con la hipótesis que predice que con el tiempo los anticuerpos a Den 1 se vuelven más monotípicos y pierden su actividad heterotípica neutralizante, sugiriendo un mayor riesgo de desarrollo de ADA (112). En este mismo estudio se pudo demostrar la capacidad de los sueros de individuos inmunes a Den 1 colectados a los 20 años de la primoinfección, de producir ADA “in vitro” frente al virus Den 2 genotipo asiático aún a diluciones muy bajas (1/10). Particularmente, el 17% de los sueros sin actividad neutralizante heterotípica frente al virus Den 2 fue capaz de inducir una inmunoamplificación significativa frente a este mismo virus. Estos resultados “in vitro” sugieren que si el ADA está definitivamente involucrado en el mecanismo patogénico inicial de la FHD/SCD, un elevado número de individuos pudiera estar en riesgo de desarrollo de la enfermedad durante la segunda infección por el virus Den 2 genotipo asiático.

Tabla 4: Neutralización de virus dengue en sueros en sueros de individuos inmunes a Den 1 colectados 4-8 años (grupo 1) y 20-22 años (grupo 2) después de la infección primaria

Serotipo/cepa	Grupo 1		Grupo 2	
	Positividad (%)	TPG*	Positividad (%)	TPG
Den 1 (Jamaica/77)	50 (100)	93	89 (100)	140.6
Den 2 (A15/81)	6 (12)	5.5	19 (21)	6.5
Den 2 (I348600)	36 (72)**	30	40 (45)***	10.2
Den 3 (116/00)	4 (8)	5.6	9 (10)	5.9
Den 4 (Dominica)	1 (2)	5.1	13 (15)	6.2

*TGP: recíproco del título promedio geométrico de anticuerpos neutralizantes; ** p<0.00001 comparado con Den-2 (A15/81), Den-3 y Den-4 en el grupo 1; *** p<0.01-0.0001 comparado con Den-2 (A15/81), Den-3 y Den-4 en el grupo 2.

**** p<0.001 comparado a la cepa I348606 (genotipo americano) de Den 2 en ambos grupos

La evaluación de la respuesta de células T en linfocitos mononucleares de individuos inmunes a Den 1 o Den 2 y cuya infección había ocurrido 20 años antes de la colecta de sangre demostró la existencia de una inmunidad celular serotipo específica y serotipo cruzada de memoria de larga duración aún después de 20 años de la primoinfección (113).

Este hallazgo pudiera estar relacionado a la mayor severidad observada en individuos que sufren su segunda infección después de largos intervalos de la primoinfección.

Las observaciones clínicas, epidemiológicas e inmunológicas anteriores sugieren que una vez que un individuo es infectado por el virus Den 1 es susceptible de desarrollar DH por al menos 20 años (96). Las mismas tienen implicaciones serias con relación al control (es crucial evitar el desarrollo de grandes masas de individuos susceptibles a desarrollar DH) y al desarrollo de vacunas ya que estas deben ser capaces de brindar una inmunidad protectora de larga duración a los cuatro serotipos virales para evitar la posible inmunosensibilización inducida por la propia vacuna.

4.1.2 Raza como factor de riesgo de DH

Durante la epidemia de 1981 se observó por primera vez una mayor frecuencia ($p < 0.05$) de la forma severa de la enfermedad en individuos de color de piel blanca. En la tabla 5 se presentan los porcentajes de individuos de color de piel blanca en varios grupos de pacientes con un diagnóstico confirmado de FHD/SCD en la epidemia de 1981 y se comparan al porcentaje presente en la población cubana según el Censo Nacional de Población y Viviendas de 1981. El estudio seroepidemiológico a virus dengue realizado en 1983 en el municipio Cerro (uno de los municipios con un mayor número de casos reportados durante la epidemia de 1981) demostró que la frecuencia de infección por virus Den 2 fue similar entre blancos y negros lo que sugiere que la mayor frecuencia de casos de DH en los blancos no se debió a una mayor frecuencia de infección por el virus (100,101,104,105,108,109,114,115).

Tabla 5. Porcentaje de individuos de color de piel blanca y negra en varios grupos de pacientes cubanos con FHD/SCD (epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002)

Epidemias	1981				Población Cubana*	1997		Población S. Cuba**	2001-2002	
	Niños		Adultos			Adultos			Adultos	Población C. Habana**
	FHD/SCD	Fallecidos	FHD/SCD	Fallecidos		FHD/SCD	Fallecidos			
Blancos	86	86	81	77	66	46.7	36.3	30.1	93.7	63
Negros	7	3	6	9	12	16	9	26.8	0	16
No. casos	124	72	104	22***	-	169	11***	-	16***	-

*Censo de población de 1981; **Distribución población Santiago de Cuba (1997) y Ciudad Habana (2002) según color de la piel;

***Se excluyeron del análisis los pacientes con antecedentes de anemia de células falciforme.

Posteriormente, en la epidemia de 1997 se realizó una observación similar: los individuos de piel blanca tuvieron un riesgo 2.57 veces mayor que los de piel negra de desarrollar la forma severa de la enfermedad. Finalmente, durante la epidemia del 2001-2002 se observó una mayor frecuencia de casos de SCD en los individuos de piel blanca. Aunque este análisis pudiera estar sesgado por la clasificación de los casos (la clasificación se realizó según color de la piel y no por estudios antropométricos), es llamativo que en tres epidemias diferentes se realizara la misma observación. El Dr. Arístides Agramonte reportó una observación similar durante una epidemia de dengue ocurrida en Cuba en el siglo XIX (116). En aquel momento, este autor describió que aparentemente “las razas de color” tenían una mayor resistencia al desarrollo de la enfermedad.

Recientemente se estimó que la tasa de transmisión de dengue en Haití es del 30% y que tres serotipos del virus, Den 1, 2 y 3, co-circulan en este país, no obstante no reportan casos de DH a pesar de la elevada transmisión, la co-circulación viral y la presencia de un 85% de individuos con anticuerpos a dengue (117).

Dos estudios “in vitro” apoyan los estudios anteriores. Utilizando cultivos de linfocitos de sangre periférica de individuos blancos y negros no inmunes a dengue se demostró la mayor multiplicación del virus Den 2 en las células de los blancos cuando las mismas se enfrentaban al virus en condiciones favorables para la inmunoamplificación (presencia de concentraciones subneutralizantes de anticuerpos). Este primer estudio sugiere que las células de individuos blancos son más permisivas que las de los negros a la multiplicación de este serotipo en condiciones de inmunoamplificación (118).

Por otra parte linfocitos de sangre periférica de individuos blancos inmunes a virus Den 1 o Den 2 que fueron enfrentados a los cuatro serotipos individualmente mostraron una mayor capacidad de linfoproliferación que células de individuos negros en los que la estimulación

fue baja y serotipo específica (113). Se ha demostrado que después de una primoinfección por dengue se producen células T de memoria serotipo específicas y serotipo cruzado (39,44). Las primeras, se estimularían en el curso de una segunda infección, con una activación intensa y producción de citoquinas y mediadores. Los resultados de nuestro estudio sugieren una mayor frecuencia de células T serotipo cruzado en individuos blancos a diferencia de los negros donde la respuesta es más específica (119,120). Estos resultados guardan relación con la observación epidemiológica del cuadro severo de la enfermedad principalmente en los individuos blancos.

4.1.3 Enfermedades crónicas como factor de riesgo de DH

Durante la epidemia de 1981, el asma bronquial, la anemia de células falciformes y la diabetes mellitus se observaron en una frecuencia elevada en casos con un diagnóstico de FHD/SCD. Posteriormente, durante las epidemias de Santiago de Cuba en 1997 y de Ciudad Habana en el 2001-2002 se detectaron niveles elevados de pacientes con antecedentes de anemia a células falciformes (en la primera) y de asma bronquial (en la segunda). A su vez, se detectaron cifras elevadas de pacientes con hipertensión arterial (97%) y úlcera gastroduodenal (5.5%) entre los que desarrollaron FHD/SCD durante la epidemia de 1997 (86,88,89,98,101-105). En la tabla 6 se presentan los porcentajes de asma bronquial y anemia a células falciformes en varios grupos de pacientes.

Tabla 6. Porcentaje de asma bronquial y de anemia de células falciformes en pacientes con FHD/SCD, en las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002.

Epidemia	1981			1997	2001-2002
	Niños FHD/SCD	Niños fallecidos	Adultos fallecidos	Adultos fallecidos	Adultos FHD/SCD
Asma bronquial	25*	23*	13*	8.3	18.4**
Anemia de células falciformes	0	6*	17*	8.3*	2.6**
No casos	76	71	23	12	76

*p<0.01 **p=0.000555

Considerando que la amplificación dependiente de anticuerpos juega aparentemente un papel importante en el mecanismo del DH, estudiamos la capacidad del virus Den 2 de replicarse en linfocitos de sangre periférica de 30 pacientes asmáticos y en 30 individuos sanos no inmunes a dengue. En el 90% de los pacientes asmáticos y en el 53.8% del grupo control se obtuvo una multiplicación significativa ($p<0.05$) del virus en condiciones de inmunoamplificación (121). La mayor permisividad observada en las células de los pacientes asmáticos apoya el papel del asma bronquial como factor de riesgo de DH aunque el mecanismo a través del cual se produce es desconocido. Existen reportes que plantean un mayor número de receptores Fc para los anticuerpos IgE e IgG en los macrófagos de los

pacientes asmáticos (122). Recientemente niveles elevados de anticuerpos IgE totales y específicos se han asociado al cuadro severo de la enfermedad (38,41,123).

Los mecanismos por los cuales enfermedades como el asma bronquial y la anemia de células falciformes o la raza pudieran influir en el desarrollo del cuadro severo de la enfermedad no se conocen pero se ha sugerido un componente genético asociado al desarrollo de las formas clínicas del dengue y particularmente del DH. Se conoce que sólo una pequeña proporción de individuos que sufren una IS desarrolla el DH. Otros grupos han demostrado que el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y de otros genes no asociados al MHC, se asocia con un riesgo aumentado de DH (124-126).

En estos momentos, nuestro grupo desarrolla varias investigaciones con el objetivo de identificar genes asociados al desarrollo de FD y de FHD/SCD en individuos cubanos.

4.2. Factores asociados al agente

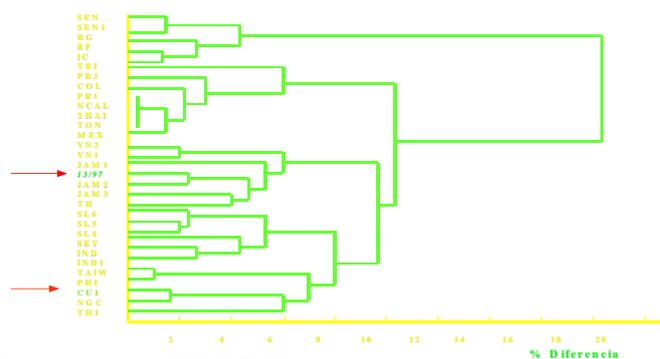
Hoy se acepta la importancia de las características del agente para explicar el cuadro severo de la enfermedad aunque fue la experiencia cubana la que por primera vez integró los componentes que participan en el desarrollo de una epidemia de dengue, siendo uno de los factores principales los relativos al virus.

El Den 2 fue aislado por primera vez en nuestra región en Trinidad-Tobago en 1953 en condiciones no epidémicas y posteriormente se asoció a la epidemia de los años 1968-1969 reportada en varios países caribeños. Para el momento en que ocurre la epidemia cubana de 1981, prácticamente la circulación de este serotipo en nuestra región no era reportada ni se había asociado al desarrollo de DH en forma epidémica (17,69).

La epidemia de 1981 estuvo causada por una cepa de virus Den 2 con capacidad de producir el DH y que no había sido aislada con anterioridad en la región. Los estudios de

caracterización molecular realizados en dos fragmentos de interés en el genoma (envoltura, nucleótidos 976 al 1273 y la zona de unión de los genes E/NS1) de cuatro cepas aisladas a partir de suero y víscera de pacientes de FD y FHD/SCD demostraron que la cepa de Den 2 causante de la epidemia de 1981 estaba estrechamente relacionada a las llamadas “cepas viejas” de Den 2 como la cepa de referencia Nueva Guinea C (1944) y Tailandia (1964) mostrando menos de un 4% de divergencia nucleotídica en el segmento del gen E estudiado y menos de un 6% en la zona de unión de los genes E/NS1. Las cepas mostraron mas de un 9.3% de divergencia con las cepas de Den 2 aisladas en Jamaica (1983) y Vietnam (1987) (figura 2). Estudios posteriores realizados directamente en una muestra de hígado procedente de un fallecido por FHD/SCD así como en una muestra de suero de un caso de FD confirmaron los resultados previos y permitieron clasificar la cepa como perteneciente a la rama de cepas viejas de Den 2 del genotipo asiático (127-129).

Figura 3. Relación genética de las cepas de Den 2 aisladas en 1981 y 1997



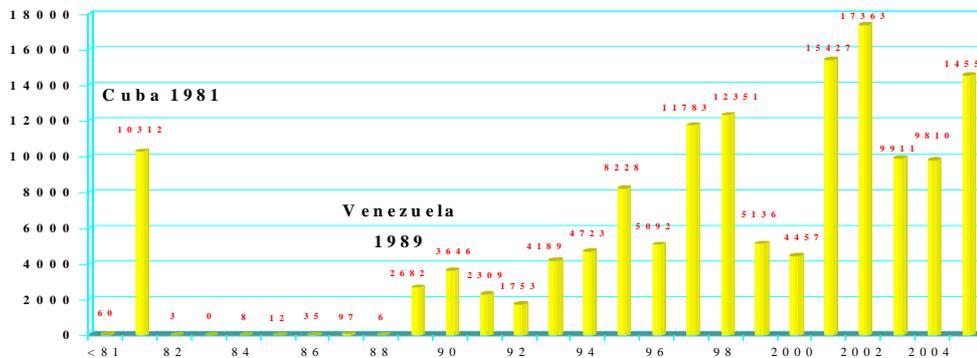
Fuente: Guzman y cols., AJTMH 1995

La aparición de esta cepa viral en nuestro país fue extemporánea ya que se trataba de una cepa que no circulaba desde los años 40 (la cepa cubana mostró la mayor homología con la

cepa de referencia Nueva Guinea C aislada en el año 1944 con la que presentó una divergencia nucleotídica de 1.7%) (127-129).

Varios autores norteamericanos han planteado que individuos cubanos en fase virémica procedentes de Vietnam introdujeron en nuestro país la cepa productora de la epidemia de 1981 y que de aquí esta se extendió a Jamaica y posteriormente al resto de la región explicando así las epidemias de DH ocurridas en varios países del área con posterioridad a 1981 (50,130,131). Los resultados obtenidos en nuestro estudio no soportan esta hipótesis. Se ha planteado frecuentemente que la introducción del DH en la región se produjo a partir de la importación a Cuba en 1981 de una cepa de virus Den-2 con capacidad de producir DH procedente de Vietnam y la exportación de la misma hacia el resto de los países. La clasificación genómica de la cepa cubana de 1981 y el reporte de DH en la región de las Américas con posterioridad a 1981 contradicen ambos planteamientos (figura 3). Puede observarse en la figura que después de 1981, se produce un intervalo de más de 8 años en los que el reporte de casos de DH en nuestra región fue extremadamente bajo ocurriendo la segunda epidemia de DH a finales de 1989 en Venezuela (1,17,69,70). Los casos de DH de 1981 están fuera de contexto y se refieren a los ocurridos en Cuba no habiéndose reportado una situación similar antes o después de esta fecha.

Figura 4. Casos de Dengue Hemorrágico reportados en la región de las Américas 1981-2005



Fuente: Organización Panamericana de la Salud, OPS

El estudio genómico de las cepas cubanas causantes de las epidemias de 1977, 1997 y 2001-2002 ha permitido su clasificación en genotipos (132). La cepa de Den 1 aislada en el año 1977 pertenece al genotipo americano y es similar a las cepas que han estado circulando en nuestra región desde el año 1977 en que se produce la introducción por primera vez de este serotipo en las Américas (133). La cepa causante de la epidemia de 1997, fue clasificada como perteneciente al genotipo Americano/Asiático en el grupo de cepas aisladas en Jamaica (1982-1983) y originarias de Tailandia (134,135). La cepa causante de la epidemia del 2001-2002 se clasificó como genotipo III de este serotipo similar a la que se introdujo en 1994 en la región (136,137).

El genoma completo de seis cepas de virus Den 2 aisladas en diferentes momentos durante la epidemia de 1997 mostraron una fuerte conservación de las proteínas estructurales y de los extremos 5' y 3' no codificantes (134,135). No obstante se observaron sustituciones nucleotídicas en los genes no estructurales y principalmente en los genes que codifican las proteínas NS1 y NS5. Se observó además un patrón de evolución de las cepas durante la epidemia observándose cambios entre las cepas aisladas al inicio y al final de la epidemia

en estas proteínas. Las implicaciones de este hallazgo deben ser estudiadas a mayor profundidad considerando que las proteínas no estructurales son fuente de epitopes de células T y que es frecuente que los epitopes reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (los que juegan un papel crucial en el control de las infecciones por virus ARN) varíen, pudiendo representar esta, una vía de escape para los virus mutantes (38,41).

El análisis filogenético del gen E de dos cepas de Den 3 aisladas a principios y final de la epidemia de 2001-2002 demostró la presencia de varias sustituciones aminoacídicas no conservadas que sugieren que el virus cambió en el transcurso de la epidemia. El significado funcional de estos cambios es objeto de estudio actualmente por nuestro grupo (137,138).

Estas investigaciones han demostrado que: a) en las epidemias de FHD/SCD cubanas las cepas aisladas tanto de Den 2 en 1981 y 1997 como Den 3 en el 2001-2002 pertenecen a genotipos asociados al desarrollo de DH b) Las cepas de Den 2 aisladas durante la epidemia de 1997 no muestran diferencias entre ellas en el gen E a diferencia de las de Den 3 en que se observan cambios aminoacídicos entre cepas aisladas en el transcurso de varios meses durante la epidemia c) Las cepas de Den 2 aisladas en los años 1981 y 1997 presentan cambios aminoacídicos en los genes E y M que son considerados actualmente como marcadores de virulencia, particularmente en el amino ácido 390 de la envoltura. Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren el papel de la virulencia de la cepa viral como un factor de importancia para el desarrollo de epidemias de DH (127-129,134,135,137).

4.3. Algunos factores epidemiológicos asociados al desarrollo de epidemias de DH en Cuba

Para que se produzca una epidemia de DH deben coincidir varios factores entre los que se destacan la elevada densidad del vector que facilite consecuentemente una elevada

circulación viral, la presencia de un elevado número de individuos susceptibles de desarrollar una IS, una secuencia de infección favorable al desarrollo de DH así como la circulación de una cepa con potencialidad para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad. De la mayor o menor coincidencia de estos factores y probablemente otros no determinados todavía dependerá la severidad de la epidemia. En las epidemias de 1981, 1997 y 2001-2002 estas condiciones han estado presentes en mayor o menor medida.

Con posterioridad a la epidemia de Den 1 del año 1977, casi el 50% de nuestra población (44.46%) quedó en riesgo de desarrollar una IS. Este hecho, de gran importancia sensibilizó a nuestra población frente a futuras introducciones de dengue (85).

Los estudios sero-epidemiológicos retrospectivos realizados en diferentes municipios del país y particularmente el realizado en el municipio Cerro en 1983 indican una elevada transmisión viral. Además permitieron estimar el número de individuos primaria y secundariamente infectados por los virus Den 1 y Den 2 durante las epidemias de 1977 y 1981. El estudio de muestras de sangre de 1945 personas mostró que el 43.7% y el 23.6% de 1295 individuos menores de 45 años tenían anticuerpos neutralizantes a los virus Den 1 y Den 2 respectivamente y particularmente el 26.1% tenían anticuerpos neutralizantes a Den 1 solamente, el 6% a Den 2 solamente y el 17.6% a ambos virus. Estos datos apoyan el elevado porcentaje de individuos que durante la epidemia de 1981 desarrollaron una IS pero a su vez indican que al menos en las condiciones del municipio Cerro, el 26.1% (inmunes a Den 1) y el 6% (inmunes a Den 2) todavía estaba en riesgo de desarrollo de una segunda infección por otro serotipo una vez eliminada la epidemia de 1981 (Tabla 7) (108,139,140).

Otros datos de interés obtenidos de este estudio fue la demostración de que las tasas de infección por Den 1 y Den 2 fueron similares entre blancos, mulatos y negros (según color

de la piel) y la estimación de que el DH se produjo en 1 de cada 23 niños y en 1 de cada 79.5 adultos con IS Den 1/Den 2 apoyando las observaciones del mayor riesgo de la enfermedad en el niño en el transcurso de la IS. Finalmente también pudo determinarse de que aparentemente las IS(s) en los mismos individuos no son un fenómeno al azar. Este estudio demostró que las infecciones por virus Den 2 ocurrieron 3.8 veces más frecuentemente en individuos previamente infectados por el virus Den 1 que en aquellos no inmunes a dengue. Cuando este análisis se extendió a las viviendas, fue evidente que las infecciones fueron más frecuentes en algunas viviendas que en otras lo que posiblemente se relaciona a la presencia de acumulo de agua y por ende posibles sitios de cría del mosquito y consecuentemente la presencia del vector (108).

Tabla 7. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes (Acs) a virus Den 1 sólo, Den 2 sólo y Den 1 y Den 2 en residentes del municipio Cerro, 1983.

Edad en el año 1981	Acs a Den 1 sólo (%)	Acs a Den 2 sólo (%)	Acs a Den 1 y Den 2 (%)	Total personas
<-4	8.1	5.8	4.6	86
5-9	38.4	1.8	17.6	164
10-14	26.8	5.8	17.5	205
15-24	28.5	6.2	17.7	350
25-34	27.9	4.7	16.9	254
35-44	17.7	10.1	22.8	236
Total	26.1	6	17.6	1295

Los estudios clínico, serológico y epidemiológicos realizados con relación a la epidemia de 1997 de Santiago de Cuba unido a los datos obtenidos a través de la vigilancia seroepidemiológica que se estableció durante la epidemia permitieron estimar la tasa de infección por virus Den 2 durante la epidemia en 4.23%, las tasas de ataque primaria y secundaria según edad y comparar el número de casos de FD y FHD/SCD confirmados por laboratorio (primarios o secundarios) con el estimado de individuos infectados en forma primaria o secundaria durante la epidemia (Tabla 8). En total se estimó que ocurrieron 17 926 infecciones por Den 2, de ellas, 13 116 de casos primarios y 4 810 de secundarios. Cuando estas cifras se comparan a los casos clínicos de FD y FHD/SCD reportados durante la epidemia, se observa que sólo el 3% de los individuos con una infección primaria por Den 2 desarrollaron el cuadro clínico de la enfermedad a diferencia de los individuos que sufrieron una IS donde todos desarrollaron el cuadro de FD o FHD/SCD. Esta observación sugiere que al menos en las condiciones de esta epidemia y para esta cepa viral en particular, la transmisión pudo pasar en forma silente y que la posibilidad de desarrollo de una IS se convirtió en un factor de riesgo para el desarrollo de la forma clínica de la infección. Este fenómeno pudiera estar ocurriendo en otras áreas de la región, contribuyendo a la transmisión relativamente silente de los virus dengue. La naturaleza relativamente benigna de la infección primaria por el virus Den 2 contrasta con el cuadro observado durante la epidemia de 1977, de Den 1 en la cual se reportaron mas de 400 000 casos de FD posiblemente en su mayoría con una infección primaria por dengue (88,97).

Tabla 8. Distribución de casos clínicos (confirmados por laboratorio) según tipo de infección y comparación al número total de infectados por Den 2 durante 1997 que experimentaron una infección primaria o secundaria.

Casos	Total	Primarios	Secundarios
Muertes	12	1	11
FHD/SCD	193	2	191
FD	5 003	395	4 608
Total	5 208	398	4 810
Infecciones por dengue	17 926	13 116	4 810

El estudio sero-epidemiológico realizado en el municipio Playa de Ciudad Habana en 2003 con posterioridad a la epidemia del 2001-2002 permitió estimar la tasa de infección por virus Den 3 durante la epidemia. Los estudios previos indican que la ciudad contaba con una población susceptible a la IS Den-1/Den-3 y Den-2/Den-3 incluyendo la posibilidad de que algunos individuos desarrollaran una infección terciaria (Den-1/Den-2/Den-3). Los resultados de este estudio demuestran la presencia de anticuerpos neutralizantes a Den 3 en el 7.2% de las 1758 muestras estudiadas sugestivo de infección con este serotipo durante la epidemia. De las muestras positivas, el 27.8% de los casos se clasificaron como infección primaria, el 4.8% como infecciones secundarias Den1/Den3 y el 17.5% como infecciones secundarias Den2/Den3 (Guzmán y cols., manuscrito en preparación). Los estudios realizados en 54 pacientes de FHD/SCD de la propia epidemia demostraron la IS Den1/Den

3 en el 75.9% y la terciaria Den1/Den 2/Den 3 en el 18.5% lo que sugiere que también en esta epidemia la IS fue un factor de riesgo principal en el desarrollo de la enfermedad (99). Si se analizan en su conjunto las tres epidemias, se observa que coincidieron en varios factores: a) presencia de un elevado número de individuos en riesgo de desarrollar una IS y el papel de esta como factor de riesgo de DH b) Las secuencias de infección Den 1/Den 2 y Den 1/Den 3, reportadas con anterioridad como asociadas al desarrollo de la forma severa de la enfermedad c) Las cepas aisladas en las tres epidemias se han asociado al desarrollo de DH d) El intervalo entre las infecciones fluctuó desde 4 hasta 25 años con el mayor riesgo a mayor intervalo entre las infecciones (al menos para la epidemia de 1997 comparada a la de 1981). La interrelación de estos factores en una misma población unidos posiblemente a una predisposición genética para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad y en condiciones donde la densidad vectorial y otros factores sociales y ecológicos favorecieron la transmisión viral tuvieron como consecuencias las epidemias observadas.

Finalmente, una observación realizada en las tres epidemias ha dado lugar a una nueva hipótesis. En las tres, se observó un incremento en la severidad de las mismas a medida que avanzaban en el tiempo. Esto se evidenció a través de diferentes índices como mortalidad por dengue, proporción de casos de FHD/SCD y de fallecidos (4,141). Esta observación inicialmente realizada durante la epidemia de 1981, se repitió durante la epidemia de 1997, ambas producidas por el serotipo 2 del virus dengue (Tabla 9). Fue muy llamativo que durante la última epidemia, en este caso por virus Den 3, también se observara un fenómeno similar (Castro O, datos no publicados).

Tabla 9. Incremento mensual en la severidad de las epidemias de 1981 y 1997

Epidemias	1981			1997		
	Junio	Julio	Agosto	Mayo	Junio	Julio
Casos dengue	96 664	183 443	43 315	706	1 785	244
Casos FHD/SCD	1 881	6 223	2 120	37	132	29
Fallecidos	38	77	40	1	6	5
Proporción Dengue/FHD/SCD	1.9%	3.4%	4.9%	5.2%	7.4%	11.9%
Fallecidos/FHD/SCD	2%	1.2%	1.9%	2.7%	4.5%	17.2%
Fallecidos/casos dengue	0.04%	0.04%	0.09%	0.14%	0.34%	2.05%

Una posible explicación a este fenómeno pudiera estar relacionada a la aparición de mutantes de escape de la neutralización: cuando los virus dengue se transmiten en una población en la cual está presente un elevado número de individuos inmunes en nuestro caso al virus Den 1, el paso del virus a través de estos individuos pudiera permitir la selección de algunos virus que escapan de la actividad neutralizante de los anticuerpos heterólogos. Esta nueva progenie viral, cuando es inoculada en un nuevo individuo inmune a Den 1 pudiera interactuar mas favorablemente con los anticuerpos amplificadores de la infección viral y consecuentemente producir la forma grave de la enfermedad. Con el objetivo de profundizar mas en este aspecto, se estudio la secuencia nucleotídica del gen E de 19 cepas de virus Den 2 aisladas en diferentes momentos durante la epidemia de 1997 y el genoma completo de 6 cepas procedentes de la misma epidemia. No se observaron cambios nucleotídicos en el gen E ni en los genes que codifican las otras proteínas

estructurales de las 6 cepas bajo estudio. Estos resultados no apoyan la hipótesis de aparición de mutantes de escape para explicar el incremento en severidad de la epidemia o al menos la participación de la proteína E en este fenómeno. No obstante, no podemos descartar que el aislamiento viral en un sistema permisivo haya seleccionado algunas variantes virales no permitiendo el estudio de otras que pueden estar presentes en menor concentración. Se requiere estudiar el genoma completo de un mayor número de aislamientos a partir de la muestra clínica garantizando el estudio de las diferentes poblaciones virales (quasispecies) presentes en la muestra (134,135).

Varios autores han demostrado que los anticuerpos neutralizantes heterotípicos juegan un papel principal en la regulación de las infecciones secundarias por dengue. Particularmente Kliks y cols., demostraron que a diluciones bajas, la presencia de anticuerpos neutralizantes heterólogos protegen al individuo de desarrollar DH durante una segunda infección (142). Resultados similares han sido reportados recientemente por Endy y cols., para el virus Den 3 (143). Con el transcurso del tiempo, la capacidad neutralizante de estos anticuerpos heterólogos se va perdiendo a medida que los anticuerpos homotípicos ganan en madurez. Este fenómeno pudiera explicar (al menos parcialmente) la mayor letalidad de la epidemia de 1997 comparada a la de 1981 (ambas causadas por cepas de Den 2 del mismo genotipo) (96,112).

5. Aspectos relativos al diagnóstico de laboratorio del Dengue

En el periodo 1980 a 2003 se han introducido y desarrollado diferentes metodologías en nuestro laboratorio que han permitido el diagnóstico de esta entidad y el fortalecimiento de la vigilancia de laboratorio tanto en Cuba como en nuestra región.

5.1 Aislamiento de virus dengue.

A principios de los años 80 sólo contábamos con el ratón lactante (inoculado por vía intracerebral) y los cultivos de células Vero (riñón de mono verde) y LLCMK2 (riñón de mono rhesus) sistemas de aislamiento del virus dengue. Para la identificación viral se empleaba la técnica de NPRP utilizando líquidos ascíticos hiperinmunes a cada serotipo viral. Estos sistemas, aunque no de los de mayor sensibilidad, permitieron realizar el diagnóstico del virus Den 2 en la epidemia de 1981. La utilización de los cultivos celulares de mosquitos como AP61 y C636, sistemas estos de mayor sensibilidad y el empleo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la identificación viral utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo fueron introducidos posteriormente y se han utilizado durante años en la práctica diagnóstica diaria permitiendo el aislamiento de virus dengue de muestras de suero y macerado de vísceras de fallecidos tanto de Cuba como de otros países del área (23,144,145). Finalmente, la aplicación de la centrifugación rápida a muestras inoculadas en cultivos de células C636/HT, metodología esta aplicada por primera vez al diagnóstico de virus dengue, permitió incrementar la frecuencia de aislamiento viral en un 16.6% y disminuir el tiempo requerido para la identificación viral. Esta metodología permitió el aislamiento de virus Den 2 en el 42.8% de las muestras de tejido de fallecidos por FHD/SCD durante la epidemia de 1997. En la tabla 10 se presenta el porcentaje de aislamiento de virus Den 2 utilizando diferentes sistemas de aislamiento viral (ratón lactante y cultivos de células LLCMK2 para muestras procedentes de la epidemia de 1981 y cultivos de células C6/36 HT con y sin centrifugación para las muestras procedentes de la epidemia de 1997) (146-148).

Tabla 10. Aislamiento de virus Den 2 en muestras de suero de pacientes (1981 y 1997) utilizando diferentes sistemas de aislamiento viral

Epidemia 1981		Epidemia 1997	
N (40)*		N (30)	
Ratón Lactante	Células LLCMK2	Células C636/HT	Células C636/HT/Centrifugación
No (%)	No (%)	No (%)	No (%)
9 (22.5)	19 (47.5)	17 (56.6)	22(73.3)

*N: número de muestras

5.2 Detección del genoma viral.

La RCP ha sido exitosamente aplicada en la identificación temprana del agente etiológico de las epidemias de 1997 y 2001-2002, en el diagnóstico de fallecidos por dengue así como en el estudio mediante secuenciación nucleotídica de varias cepas de dengue aisladas en Cuba y en otros países del área. Además permitió detectar el genoma del virus Den 2 en muestras de suero y vísceras incluidas en parafinas procedentes de la epidemia de 1981. En la tabla 11 se presenta la detección de virus Den 2 mediante RCP en muestras de fallecidos de las epidemias de 1981 y 1997 (91,129,149-151).

Tabla 11. Porcentaje de muestras de tejido de fallecidos positivas a virus Den 2 por RCP, epidemias de 1981 y 1997.

Epidemias	1981*	1997**	
	RCP	Aislamiento viral	RCP
Hígado	44.4	50	90
Bazo	42.8	33.3	85.7
Riñón	-	33.3	100
Nódulos linfoides	80	-	-

*Muestras de tejido en parafina y procesadas 15 años después de la epidemia; **Muestras de tejido frescas, comparación con el aislamiento viral en células C636/HT

5.3 Detección del antígeno viral.

La detección del antígeno viral utilizando técnicas inmunohistoquímicas es de gran utilidad en el diagnóstico de muestras de tejido procedentes de fallecidos. Esta metodología, empleada en asociación a los anticuerpos monoclonales específicos de serotipo permite la identificación del agente etiológico tanto en muestras frescas como muestras incluidas en parafina. Esta técnica ha sido empleada en el estudio de vísceras de fallecidos por FHD/SCD de las epidemias de 1981 y 1997 corroborándose una vez mas la infección por este serotipo en estos pacientes (151-153).

5.4 Estudios serológicos.

La IH fue ampliamente empleada para el diagnóstico serológico durante la epidemia de 1981 tanto en el estudio de monoseros como de sueros pareados. Para la aplicación de este sistema tuvimos que estudiar y definir los criterios de clasificación serológica tanto de infección por dengue como de infección primaria o secundaria para nuestras condiciones

teniendo en cuenta criterios utilizados por otros autores en el sudeste Asiático (25,151,154,155).

Los sistemas inmunoenzimáticos sobre fase sólida para la detección de anticuerpos IgM e IgG han sido aplicados al diagnóstico y la vigilancia de laboratorio así como en las investigaciones realizadas por nuestro grupo (23). En este sentido, la utilidad de la saliva para la detección de anticuerpos IgM a dengue fue demostrada con niveles adecuados de sensibilidad (90.3%) y especificidad (92%) que permiten su recomendación en aquellas situaciones donde la toma de muestras de sangre se dificulta. La detección de anticuerpos IgA anti-dengue en suero puede utilizarse además como alternativa para el diagnóstico. Su presencia se demostró en el 94.4% de los sueros con anticuerpos IgM anti-dengue (156).

La NPRP permite determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes a cada uno de los serotipos del virus (23,151,157,158). En nuestras condiciones ha sido utilizada en los estudios de casos de FD y FHD, en las encuestas sero-epidemiológicas realizadas y en estudios de vacunas entre otros (97,159) así como para el estudio de la FA dada su importancia actual y el peligro de urbanización de la misma (160).

6. Vigilancia de Laboratorio de Dengue en Cuba

La vigilancia de laboratorio de dengue en Cuba ha jugado un papel principal en la detección, confirmación y seguimiento de las situaciones epidemiológicas ocurridas en el país así como en el alerta a las autoridades de salud del peligro de introducción de dengue estableciendo nuevas pautas y cambios. La misma ha pasado por varias etapas desde el año 1981.

Tres etapas caracterizaron la vigilancia de laboratorio durante la epidemia de 1981: a) Inicialmente permitió la confirmación de la circulación viral en las diferentes provincias y consecuentemente la toma de medidas urgentes para el manejo de los casos y el control

vectorial b) Posteriormente permitió la evaluación de la eficacia del diagnóstico c) Finalmente permitió la confirmación del total de casos clínicamente sospechosos de la enfermedad. Además de los estudios serológicos utilizando la IH, se realizaron los estudios virológicos para identificar el agente etiológico de la epidemia (88,144,155).

En el periodo 1982-1996, se mantuvo una vigilancia pasiva. Sueros pareados de casos sospechosos de dengue eran enviados al laboratorio para su estudio por IH (1982-1987) y por el Método de ELISA de Inhibición, MEI (1987- 1996). En esta etapa no se demostró la circulación de estos agentes (1).

Frente al peligro de introducción de dengue en el municipio de Santiago de Cuba a finales de 1996 se establece una búsqueda activa de casos sospechosos de la enfermedad y se introduce en la provincia el diagnóstico serológico de dengue mediante la detección de anticuerpos IgM por el UMELISA Dengue/IgM (161). Los primeros casos diagnosticados en el laboratorio provincial como casos probables fueron confirmados al día siguiente en el IPK mediante el ELISA de Captura de IgM, el MEI y la IH e identificando mediante RCP el agente etiológico como virus Den 2. La epidemia de 1997, marcó un cambio fundamental, de una vigilancia pasiva se pasó a una vigilancia activa en la que la búsqueda, notificación y la confirmación rápida de los casos por el laboratorio fue fundamental (1,86,90). En esta nueva etapa se establecieron dos laboratorios provinciales actuando IPK como laboratorio de referencia y se introduce la vigilancia molecular como etapa superior en la vigilancia de laboratorio (162). Fue fundamental el intercambio estrecho entre las autoridades de salud de la provincia, el nivel central y el laboratorio de referencia.

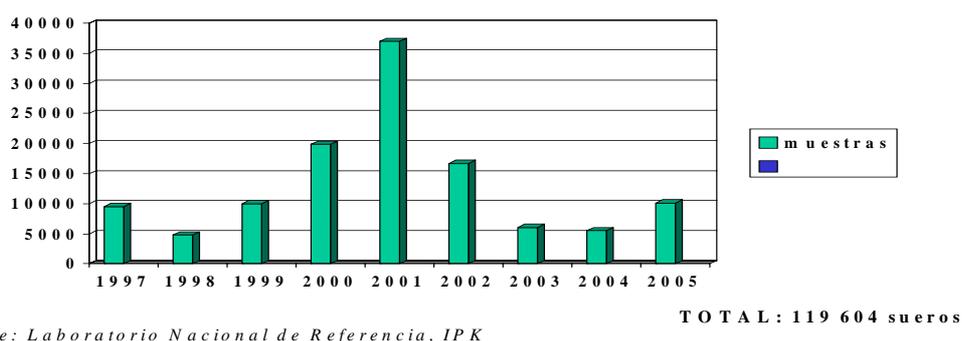
En el período 1998-2000, se mantuvo la vigilancia activa con apoyo de laboratorio. La misma permitió detectar tempranamente y confirmar rápidamente en septiembre del 2000 la introducción de dengue en un área de salud de Rancho Boyeros. La vigilancia permitió

determinar que el brote había empezado en agosto del 2000 y confirmar 138 casos de FD por los serotipos Den 3 y Den 4. El brote fue eliminado en cuatro meses (1,87).

El 29 de junio de 2001 a través de la vigilancia se detecta y confirma tempranamente la transmisión de dengue en la capital. La vigilancia serológica, virológica y molecular permitió la identificación rápida del agente etiológico, la confirmación de los casos de FHD y fallecidos, el seguimiento de la epidemia, la confirmación de la transmisión en otras provincias y la certificación del cese de la transmisión, entre otros aspectos (87,92).

La vigilancia clínico-epidemiológica y serológica ha permitido la detección de la transmisión en Ciudad Habana y en Camaguey en 2005 aislándose al serotipo 4. A su vez permitió la confirmación, seguimiento y estudio de la epidemia por virus Den 3 y Den 4 ocurrida en el país en el año 2006 (Datos del Laboratorio Nacional de Referencia). La figura 4 muestra el total de sueros procesados en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK en el período 1997-2005 recibidos a través de la vigilancia de dengue.

Figura 5. Total de muestras de suero procesadas en el Laboratorio Nacional de Referencia, IPK 1997-2005



7. Actividades de Referencia Regional

En el año 1994, nuestro laboratorio es nominado por la OPS y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como Centro Colaborador para el Estudio de las Enfermedades Víricas

siendo el dengue una de las entidades en que más se ha destacado el centro. Posteriormente, en los años 1998 y 2004 fue re-nominado en esa actividad. Entre las actividades realizadas se destacan:

1. Producción de biológicos y particularmente antígenos inactivados de dengue y el estuche para la detección de anticuerpos IgM antidengue. Estos reactivos han sido entregados a las instituciones de la región que lo han solicitado. Entre ellas el Centro de Inmunoensayos (CIE) que comercializa el UMELISA Dengue/IgM utiliza los antígenos que nuestro centro produce así como el anticuerpo monoclonal anti-envoltura dengue previamente obtenido en nuestro laboratorio (161,163).
2. Entrenamientos y asesorías entre las que se destacan las evaluaciones de los programas de control del dengue en Nicaragua (1994), Guatemala (1994), Colombia (1995) y Venezuela 1996 (164-166).
3. Organización de los cursos internacionales de dengue que se realizan en nuestro centro desde el año 1987 y cuya última edición (la novena) se realizó en agosto de 2005. En total, 435 especialistas de diferentes disciplinas, de ellos 153 cubanos, se han beneficiado de esta actividad.
4. Participación como profesor en varios cursos organizados en otros países del área como República Dominicana (1989, 1990), Perú (1991), Argentina (1997, 1999, 2000), Venezuela (1999), México (2003), EUA (2003), Costa Rica (2003), Brasil (2004) y Cuba.
5. Organización y ejecución de las Pruebas de Control de Calidad del diagnóstico serológico del dengue en los países de la región. Nuestro centro, desde el año 1996 organiza, en colaboración con la OPS, los controles de calidad del diagnóstico serológico de dengue en la región (167,168). En total se han realizado seis

controles, contando con la participación de 18 países en el período total. El último control de calidad realizado concluyó en julio del 2006.

6. Estudio de varias epidemias ocurridas en la región en colaboración con las instituciones del área: Nicaragua en 1985, Ecuador en 1988, Perú en 1994, Costa Rica y Panamá en 1993, Nicaragua en 1994. Como aspecto de gran relevancia se destaca el diagnóstico de la reintroducción del virus Den 3 en la región de las Américas después de más de 17 años de ausencia, diagnóstico y reporte a la OPS realizado por nosotros a partir de la epidemia ocurrida en el año 1994 en Nicaragua. A su vez se alertó de las características de la cepa al estar asociada al desarrollo de casos de DH y consecuentemente del peligro que representaba su introducción para la región (76,78,136,169-171).
7. Desarrollo de investigaciones conjuntas con otras instituciones de la región para resolver problemas de interés como la utilización del papel de filtro para la toma de muestras de sangre útil en el diagnóstico serológico y realizado entre el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) de Nicaragua, el Instituto Nacional Costarricense para la Investigación y Docencia en Nutrición y Salud (INCIENSA) de Costa Rica y el IPK; la normalización de un sistema inmuno-enzimático para la detección de antígeno de dengue en sueros, realizado en colaboración con el INCIENSA de Costa Rica; la normalización y aplicación de un ELISA para la detección de anticuerpos IgM en saliva y de anticuerpos IgA antidengue en saliva y suero realizado en colaboración con el CNDR de Nicaragua; la normalización de un protocolo de RCP para el diagnóstico de dengue realizado en colaboración con el Centro Conmemorativo Gorgas de Panamá y el Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia; el análisis por restricción enzimática de cepas de dengue del

área realizado en colaboración con la Universidad de Honduras, el CNDR de Nicaragua y el INCIENSA de Costa Rica; el desarrollo de encuestas sero-epidemiológicas de dengue en Nicaragua en 1985 y Ecuador en 1988 así como estudios serológicos en grupos de riesgo en Nicaragua, Costa Rica, El Salvador, Colombia y Panamá (146,147,150,156,170,172).

8. Participación en la implementación de la Estrategia Integrada para la Prevención del Dengue, nueva iniciativa de la OPS con el objetivo de ayudar a los países de la región a disminuir la morbilidad y mortalidad por dengue. Particularmente, hemos participado como miembro del grupo de trabajo (GT) GT/dengue en la discusión de esta nueva estrategia desarrollada en Santa Cruz Bolivia en 2003 y en su extensión a Venezuela, 2004 y Paraguay, 2005 (80).
9. Participación en varios comités de expertos del Programa Especial de Entrenamiento e Investigación en Enfermedades Tropicales (TDR) y de la OMS dirigidos a:
 - a) El fortalecimiento de la estrategia global de prevención y control del dengue
 - b) El análisis del diagnóstico de esta entidad y de la evaluación de los estuches comerciales actuales
 - c) Definición de las prioridades de investigación en dengue
 - d) Definir las estrategias para el desarrollo de vacunas
 - e) Desarrollo de las Guías Clínicas para los Estudios de Evaluación de Vacunas de Dengue en el hombre
 - f) Implementación de la red informativa global de dengue, Dengue/Net
 - g) Desarrollo de las nuevas Guías de Prevención y Control del dengue (25,56, 62,63,68,173-176).
10. Las actividades realizadas con relación a dengue permitieron la nominación en julio de 2005, del nuevo Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector.

8. Investigaciones relativas a una vacuna contra el dengue

En el año 1992, y a solicitud de nuestro centro, comenzamos en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) el desarrollo de un proyecto de investigación para la obtención de una vacuna contra el dengue. Los objetivos del proyecto fueron presentados y aprobados por nuestro comandante en una reunión efectuada en el Palacio de la Revolución a finales de 1991. En sus inicios el proyecto incluía tres estrategias: la obtención de una vacuna atenuada, la caracterización de zonas de interés inmunológico en la proteína de membrana del virus y la obtención de una proteína recombinante de dengue expresada en levadura, siendo esta última la estrategia principal (55,177-181).

Con el objetivo de obtener una vacuna atenuada, se realizaron pases seriados de la cepa A15 del virus Den 2 en cultivos primarios de riñón de perro beagle. El estudio de diferentes marcadores sugirió que el pase seriado resultó en la obtención de varios cambios estables sugestivos de atenuación (Tabla 12). Siguiendo esta metodología, posteriormente se atenuaron cepas de los virus Den 4 y Den 1 lográndose resultados similares. El no contar con las condiciones de producción en el país para una vacuna atenuada así como el desarrollo posterior por investigadores de otros países de una vacuna tetravalente atenuada a dengue la que ha sido licenciada por Sanofi Pasteur hizo que esta línea de trabajo se detuviera. No obstante, las cepas atenuadas obtenidas están siendo estudiadas molecularmente con el objetivo de determinar posibles marcadores de atenuación aspecto de gran importancia en el desarrollo de vacunas (178).

Tabla 12. Resumen de las propiedades biológicas de una cepa cubana de virus Den 2 con diferente número de pases en cultivos primarios de riñón de perro beagle.

Propiedad biológica	# pases en cultivos primarios riñón perro						
	Parental	20	40	52	53	54	55
Sensibilidad Temp. 39.2 ⁰ C	-	-	-	+	+	+	+
Tamaño placa (mm)	1.5	1.5	1.4	1.5	1.1	0.8	1
ECP* en células LLCMK2	+	+	+	-	-	-	-
ECP en células C636/HT	+	+	+	-	-	-	-
% reducción neurovirulencia ratón	81	51	71	90	89	78	97

*ECP: efecto citopático

Teniendo en cuenta que la proteína E (55-60 kDa) es la proteína principal del virus ya que en ella radican sus propiedades biológicas principales, decidimos clonar y expresar la misma en *Pichia pastoris*. La inmunización en monos irus de la proteína E del virus Den 4 (E4rec) indujo el desarrollo de anticuerpos neutralizantes y protección observándose el acortamiento o aclaración de la viremia (Tabla 13) así como una respuesta anamnésica significativa después del reto. Este estudio es el primero que se realiza en nuestro país y el primero internacionalmente que demuestra que la proteína E de dengue expresada en levadura *Pichia pastoris* es capaz de inducir protección frente al reto con el virus salvaje (179).

Tabla 13. Viremia (detectada por RCP) y recíproco del título de anticuerpos neutralizantes en monos irus inmunizados con la proteína E4rec y retados con virus

Den 4.

	Media y rango de viremia (en días)*	TPG el día del reto viral**	TPG al día 30 después del reto
Animales inmunizados (N=3)	4 (4-8)	30	229***
Animales controles (N=3)	9.3 (6-14)	<10	44

* viremia (virus en sangre). ** TPG (título promedio geométrico de anticuerpos)

***p<0.05

En estos momentos estamos evaluando la utilidad del dominio III de la proteína E de los cuatro serotipos del virus. Los resultados obtenidos en animales inmunizados (ratones y monos) sugieren que es una vía a seguir y profundizar como posible candidato vacunal futuro (181).

9. Costo de las epidemias.

Uno de los aspectos más importantes y menos estudiados en las epidemias de dengue ha sido el costo de las mismas si se considera el número de individuos afectados como enfermos o como trabajadores involucrados en las tareas de control de la epidemia. En la tabla 14 se presenta un estimado de las afectaciones económicas durante las epidemias de 1981 y de 1997. En el año 1981 se invirtieron en sólo cuatro meses, \$103 151 643 USD principalmente en los gastos generados por la lucha antivectorial, por concepto de

hospitalización de los pacientes y los valores dejados de producir. Durante la epidemia de 1997, se invirtieron \$10 251 539 USD, el 76% se empleó en la lucha antivectorial y el 18% en costos hospitalarios. Diferentes estudios muestran cifras variables de costo por enfermo en las diferentes situaciones epidemiológicas. En Cuba en 1981, el costo aproximado por enfermo fue de \$299.00 USD, en Puerto Rico en 1977 se estimó entre \$26-31.00 USD, en las epidemias de Tailandia de 1980 y 1994 fue de \$158.00USD y \$257.00 USD respectivamente. En Santiago de Cuba en 1997, fue de \$594.00 USD siendo posiblemente la cifra por paciente mas elevada de las reportadas hasta el momento. Esta debe ser más elevada si se incluyen los costos de seguridad social, los costos por bienes dejados de producir y la afectación al turismo, aspectos estos no considerados en el análisis del costo de la epidemia de 1997 (182-186).

Tabla 14. Estimado del costo total y por actividad incurrido durante las epidemias de Den 2 de 1981 y 1997.*

	Epidemia 1981	Epidemia 1997
Hospitalización**	41 108 843	1 918 617
Lucha antivectorial	43 000 000	7 787 500
Gastos Seguridad Social	4 724 040	507 200***
Valores dejados de producir	14 318 760	ND****
Otros	-	38 222
Total	103 151 643	10 251 540

* En USD. **Incluye atención servicios de urgencia y medicamentos de pacientes ambulatorios ***Solo en el Sector Salud ****ND:No determinado

Consideraciones

1. Los estudios virológicos, inmunológicos y serológicos y los estudios clínicos y epidemiológicos han permitido la caracterización de las epidemias cubanas de 1981, 1997 y 2001-2002 así como su diagnóstico temprano y seguimiento, factores estos determinantes en su control y eliminación.
2. Se caracterizó por primera vez el cuadro de DH en el adulto y se confirmó que el cuadro severo en el niño era similar al observado en el sudeste Asiático y Pacífico Occidental
3. La IS se confirmó como factor de riesgo de desarrollo de DH; se demostró además que las infecciones terciarias pueden estar asociadas al cuadro severo de la enfermedad.
4. Se estimaron por primera vez las tasas de DH según IS y grupo de edad demostrándose el mayor riesgo en las edades más tempranas de la vida.
5. Se reportó por primera vez la mayor severidad de la enfermedad a medida que el intervalo entre las infecciones primaria y secundaria se incrementa.
6. Se identificaron otros factores de riesgo de DH como la raza blanca y algunas enfermedades crónicas como asma bronquial, diabetes mellitus y anemia a células falciformes.
7. La caracterización molecular de la cepa de Den 2 aislada en el año 1981 demostró que era una cepa diferente a las aisladas con anterioridad en nuestra región así como a la reportada en Vietnam en esos años.

8. Se caracterizaron molecularmente los agentes etiológicos de las epidemias de dengue de 1981, 1997 y 2001-2002 clasificándose como cepas con potencialidad de desarrollo de FHD/SCD
9. Se presentó por primera vez un enfoque integral para explicar las epidemias de Dengue Hemorrágico en que el desarrollo de una epidemia de FHD/SCD depende de la interacción de factores del individuo, el agente y de las condiciones epidemiológicas.
10. Se demostró en tres condiciones epidémicas diferentes el incremento en la severidad de la epidemia a medida que la misma avanza en el tiempo lo que dio lugar a la hipótesis de la aparición de mutantes de escape de la neutralización.
11. Se normalizaron, introdujeron y desarrollaron varios sistemas para el diagnóstico virológico, serológico y molecular que han permitido el diagnóstico de casos y epidemias de dengue en Cuba y en la región y que hacen que nuestro país cuente con la tecnología mas avanzada para el diagnóstico de esta enfermedad.
12. La vigilancia nacional de laboratorio ha permitido la detección temprana de epidemias para la toma de las acciones de control correspondiente así como su seguimiento y estudio.
13. El impacto de la actividad a escala regional se ha visto reflejado a través de la detección de la reintroducción del virus Den 3 en la región de las Américas después de 17 años de ausencia, la formación de personal, el control de calidad del diagnóstico serológico, el estudio de epidemias, el desarrollo de investigaciones conjuntas y la evaluación de programas de control en otros países.
14. Como parte de las investigaciones en vacunas se estableció un modelo para la obtención de vacunas atenuadas y se cuenta con un candidato vacunal basado en

una estrategia recombinante que ha brindado resultados satisfactorios en los estudios preclínicos.

15. El país cuenta con un grupo de investigadores de elevado nivel científico y prestigio internacional lo que ha influido positivamente en la nominación por parte de la OPS y la OMS del Centro Colaborador OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su Vector.

Bibliografia citada

1. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Inf Dis.* 2002; 2: 33-42
2. Roses M, Guzman MG. Dengue y dengue hemorragico en las Americas. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2007; 21:187-191
3. Mairuhu ARA, Wagenaar J, Brandjes DPM, van Gorp ECM. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23: 425-433
4. Guzman MG. Deciphering Dengue: the Cuban experience. *Science.* 2005; 309:1495-1497
5. Saker L, Lee K, Cannito B, Gilmore A, Campbell-Lendrum D. Globalization and infectious diseases: a review of the linkages. *TDR/STR/SEB/ST/04.2*
6. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G (Eds), CAB International, New York, 1997, pp. 1-22
7. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LT. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Medicine.* 2004;10:S98-A109
8. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2006;20:407-415
9. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.* 2005; 2: 1-10
10. Gubler DJ, Reiter PM, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent-borne diseases. *Environmental Health Perspectives.* 2001; 109:223-233

11. Rosa-Freitas MG, Schreiber KV, Tsouris P. Associations between dengue and combinations of weather factors in a city in the Brazilian Amazon. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2006; 20:256-267
12. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*. 2000; 74:74-77
13. Calisher CH. Persistent Emergence of Dengue. *Emerg Inf Dis*. 2005; 11: 738-739
14. Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. Dengue virus RNA polymerase NS5: a potential therapeutic target? *Current Drug Targets*. 2006; 7:1623-1638
15. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE. *Fields Virology*. 4th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001
16. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990; 44: 649-688
17. Pan American Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Scientific Publication No. 548, 1994
18. 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
19. Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*. 2006; 11:1238-1255

20. Martinez E. La prevencion 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*. 2006; 20:60-74
21. Castro O, Gonzalez D, Pelegrino JL, Guzman MG, Kouri G. Dengue y Dengue Hemorrágico en Cuba. Aportes a la clínica y manejo de casos. *Rev Panam Infectol*. 2004; 6: 39-42
22. Martinez E. Dengue hemorragico en criancas. Editorial Jose Marti, La Habana pp 1-180, 1992
23. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Inf Dis*. 2004; 8: 69-80
24. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In Gubler DJ, Kuno G (Eds), CAB International, New York, pp. 313-333, 1997
25. Guzmán MG, Alvarez M, Vazquez 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, WHO/TDR/Geneva Switzerland. TDR/IRM/DIAG/DEN/05.1. , 2005.*
26. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Gubler DJ, Kuno G (Eds), CAB International, New York, pp. 335-366, 1997.
27. 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

28. Barkham TM, Chung YK, Tang KF, Ooi EE. The performance of RT/PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100:142-148
29. Nawa M, Takasaki T, Yamada KI, Akatsuka T, Kurane I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods.* 2001; 92: 65-72
30. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952; 1: 30-50
31. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovery. *Yale J Biol Med.* 1970; 42: 311-328.
32. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in dengue shock syndrome. A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. *Am J Epid.* 1984; 120, 653-669
33. Halstead SD. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy.* 1982; 31: 202-209
34. Morens DM, Halstead SD. Measurement of antibody dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol.* 1990; 70: 2909-2914.
35. 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: 849-856

36. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chatuverdi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 20: 151-155
37. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. 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: 1473-1480
38. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006; 80:11418-11431
39. Rothman A L, Ennis F A. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology.* 1999; 257: 1-6.
40. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2001; 8: 377-388
41. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current Opinion Inf Dis.* 2006; 19:429-436
42. Chatuverdi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 28: 183-188
43. Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, X. N. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul, A. Chairunsri, S. Sawasdivorn, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, P. T. Yenchitsomanus, A. McMichael, P. Malasit, and G. Screaton. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003; 9: 921-927

44. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol.* 2001; 11: 301-311
45. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 2006; 19:127-132
46. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005; 36:425-435
47. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T and B cell dependent immunity are less critical. *J Virol.* 2004; 78:2701-2710
48. Fink J, Gu F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol.* 2006;16:263-275
49. Rosen L. La pathogenese de la dengue hemorrhagique: discussion critique des hypotheses actuelles. *Bull Soc Path Ex.* 1986; 79: 342-349
50. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003; 59:315-341
51. Leitmeyer K, Vaughn D, Watts DM, Salas R, Villalobos de Chacon I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999; 73: 4738-4747
52. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol.* 2003; 77: 3929-3928
53. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparison of

- isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 427-434
54. Armstrong PM, Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68:539-544
55. Guzman MG, Mune M, Kouri G. Dengue vaccine: priorities and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004; 2: 1-17
56. Hombach J, Barret AD, Cardoso, J, Deubel V, Guzman MG, Kurane I, Roehrig JT, Sabchareon A, Kieny MP. Review on flavivirus vaccine development. Proceedings of a meeting jointly organised by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine.* 2005; 21: 2689-95.
57. Halstead SB, Deen J. The future of dengue vaccines. *Lancet.* 2002; 360: 1243-1245
58. Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol.* 2003; 33: 567-582
59. Deen JL. The challenge of dengue vaccine development and introduction. *Trop Med Int Health.* 2004; 9: 1-3
60. Almond J, Clemens J, Engers H, Halstead S, Khiem H, Pablos-Mendez A, Pervikov Y, Tram T. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, Vietnam. *Vaccine.* 2002; 20: 3043
61. Guzman M, Kouri G, Diaz M, Llop A, Vazquez S, Gonzalez D, Castro O, Alvarez A, Fuentes O, Montada D, Padmanabha H, Sierra B, Perez A, Rosario D, Pupo M, Diaz C, Sanchez L. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. *Exp Rev Vaccines.* 2004; 3:511-20

62. World Health Organization. Strengthening implementation of the global strategy for Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever, prevention and control. Report of the Informal Consultation, 18-20 October 1999, WHO HQ, Geneva, 1999.
63. World Health Organization. Scientific Working Group on Dengue. Meeting report. 3-5 April 2000, Geneva, Switzerland. TDR/DEN/SWG/00.1, 2000.
64. Organización Panamericana de la Salud. Nueva Generación de Programas de Prevención y Control del Dengue en las Américas. OPS/HCP/HCT/206/02, 2002.
65. World Health Organization. Key Issues in Dengue Vector Control Toward the Operationalization of a Global Strategy, WHO, Geneva, 6-10 June, 1995, CTD/FIL (DEN)/IC/96.1
66. San Martin JL, Prado M. Risk perception and strategies for mass communication on dengue in the Americas. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2004; 15: 135-139, 1995.
67. Parks W, Lloyd L. Planificación de la movilización y comunicación social para la prevención y el control del dengue. Guía paso a paso. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud, 2004.
68. Kroeger A, Nathan M, Hombach J, TDR Reference Group on Dengue (Castro A, Focks D, Gubler D, Lloyd L, Guzman MG, Halstead SB, Kalayananoj S, San Martin JL, Vasudevan S. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:360-361
69. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003; 27: 1-13
70. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *Wld hlth statist quart*. 1997; 50: 161-168

71. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J. La Emergencia de la Fiebre Hemorrágica del Dengue en las Americas: Re-emergencia del Dengue. Rev Cubana Med Trop. 1999; 51:5-13
72. Pan American Health Organization. Dengue in the Caribbean, 1977. Scientific Publication, No. 375, 1979
73. Boshell J, Groot H, Gacharna MG, Márquez G, González M, Gaitan MO. Dengue en Colombia. Biomédica. 1986; 6 : 101-106
74. Ventura AK, Hewitt CM. Recovery of dengue-2 and dengue-3 viruses from man in Jamaica. Am J Trop Med Hyg. 1970; 19 :712-715
75. CDC. *Aedes albopictus* infestation-United States, Brazil. MMWR. 1986; 35: 493-495
76. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, Reyes J, Acevedo F. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 1996; 1: 193-199
77. Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43:55-57
78. Palacio M, Amador JJ, Acevedo F, de los Reyes J, Ramirez A, Gonzalez A, Huelva G, Jimenez R, Ruiz F, Cuadra R, Guzman MG, Kouri G, Soler M, Alvarez M, Rodriguez R, Martinez E, Quiroz E, Bayard V, Campos C, Vasquez MO. Dengue Type 3 Infection- Nicaragua and Panamá, October-November, 1994. MMWR. 1995; 44:21-24
79. Kouri G, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. Bull World Health Organ. 1989; 67: 375-380

80. San Martín JL, Brathwaite-Dick O. Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del dengue (EGI-dengue), su implementación en la Región de las Américas. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2007; 21:55-63
81. Valdes Castro J. Nota sobre la epidemia del dengue en la Isla de Cuba durante el año de 1828. *Anales Academia de Ciencias de Cuba*. 1871-1872; 8: 435-444
82. Delfin M, Coronado TV. Dengue en la Habana en 1897. *Cron Med Quir*. 1897; 10: 185-192
83. Pittaluga G. Sobre un brote de dengue en la Habana. *Rev Med Trop Parasitol Bacteriol Clin Lab*. 1945; XI:1-3
84. Mas P. Dengue Fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. In *Dengue in the Caribbean, 1977*. Pan American Health Organization. Scientific Publication, No. 375, 1979
85. Cantelar N, Fernandez A, Albert L, Perez E. Circulation de dengue en Cuba, 1977-1979. *Rev Cubana Med Trop*. 1981; 33: 72-78.
86. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonell I, Rosario D, Vázquez S, Laferte J, Delgado J, Cabrera MV. Reemergence of Dengue in Cuba : a 1997 Epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Inf Dis*. 1998; 1: 89-92
87. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, Rosario D, Mora R, Quintana I, Bisset J, Cancio E, Masa AM, Casro O, Gonzalez D, Avila LC, Rodriguez R, Alvarez M, Pelegrino JL, Bernardo L, Prado I. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Inf Dis*. 2004; 10: 719-722
88. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Morier L, Vazquez S, Diaz A, Fernández R, Ruiz A, Ramos A, Martínez R. Dengue en Cuba: Historia de una epidemia. *Rev Cubana Med Trop*. 1988; 40: 29-49

89. Kourí G, Guzmán M, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba. History of an epidemic. Bull Pan Am Health Organ. 1986; 20: 24-30.
90. Valdés L, Guzmán MG, Kourí G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, Rosario D, Vázquez S. La Epidemiología del Dengue en Cuba en 1997. Rev Panam Salud Publica/ Pan American Journal of Public Health. 1999; 6, 16-25
91. Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, Cabrera MV, Kouri G. Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases in Cuba, 1997. Int J Inf Dis. 1999; 3: 130-135.
92. Guzman MG, Peláez O, Kourí G, Quintana I, Vázquez S, Pentón M, Ávila LC, Rosario D, González D, Córdova E, Castro O, Rodríguez R, Masa AM, Álvarez M, Bisett J, Vázquez J, Fuentes O, Díaz M, Pelegrino JL, Martínez E, San Martín JL. Caracterización final y lecciones de la epidemia de dengue 3 en Cuba, 2001-2002. Rev Panam Salud Publica/ Pan American Journal Public Health. 2006; 19: 282-289
93. Guzman MG, Kourí G, Vázquez S, Rosario D, Bravo J. DHF in Cuba, 1981 & 1997. Some Interesting Observations. Dengue WHO Bull. 1999; 23: 39-43.
94. Guzman MG, Kouri G, Pelegrino JL. Enfermedades Virales Emergentes. Rev Cubana Med Trop. 2001; 53: 5-15
95. Guzman MG. Sequential dengue infection. The Cuban experience. Dengue digest. MICA (P) 193/06/2005 2, No 3, September 2005.
96. Guzman MG, Kourí G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue 2 infections occurring at an interval of 20 compared with 4 years after dengue 1 infection. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 2002; 11: 223-227.

97. Guzman, MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Alvarez M, Vázquez S, Delgado I, Halstead SB. Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol.* 2000; 152; 793-799
98. Gonzalez D, Castro OE, Kouri G, Perez J, Martinez E, Vazquez S, Rosario D, Cancio R, Guzman MG. Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. *Int J Infect Dis.* 2005; 9:280-285
99. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB, Guzman MG. Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 1 - 3 infections at a long interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75:1113-1117
100. Guzmán M, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernández R. A study of fatal dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ.* 1984; 18: 213-220
101. Guzmán MG, Kourí G, Martínez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, Vazquez S, Morier L. Clinical and serological study of Cuban children with Dengue Shock Syndrome (DSS). *Bull Pan Am Health Organ.* 1987; 21: 270-279
102. Diaz A, Guzmán MG, Kourí G, Lobaina L, Bravo J, Ruiz A, Ramos A, Martinez R. Description of the clinical picture of Dengue hemorrhagic Fever\Dengue Shock Syndrome (DHF\DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ.* 1988; 22: 133-144
103. Guzmán M, Kouri G, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Santos M, Villaescusa R, Basanta P, Indan G, Ballester JM. Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba, 1981. II Clinical investigations. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78: 239-241.

104. Guzmán M, Kouri G, Bravo J, Calunga M, Soler M, Vazquez S, Venereo C. Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba, 1981. I Serological confirmation of clinical diagnosis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1984 ; 78: 235-238.
105. Bravo J, Kouri G, Guzman MG. Why Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba. I Individual risk factors for Dengue Hemorrhagic Fever? *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81: 816-820
106. Martinez E, Guzmán MG, Valdes M, Soler M, Kouri G. Fiebre del dengue y dengue hemorrágico en infantes con infección primaria. *Rev Cubana Med Trop.* 1993; 45: 97-101.
107. Gamble J, Bethell D, Day NPJ, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, Farrar JF, White NJ. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock. *Clin Science.* 2000; 98:211-216
108. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue Hemorrhagic Fever in Cuba 1981. A retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42: 179-184
109. Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, de la Hoz F, Soler M, Hernández D. Encuesta seroepidemiológica retrospectiva a virus dengue en los municipios Cienfuegos y Palmira. *Rev Cubana Med Trop.* 1989; 4: 321-332
110. Guzman MG, Kourí G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Inf Dis.* 2002; 6: 118-124.
111. Fisher DB, Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. V. Examination of age specific sequential infection rates using a mathematical model. *Yale J Biol Med.* 1970; 42:329-349

112. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Berbnardo L, Montes T, Vazquez S, Morier L, Alvarez A, Gould EA, Kouri G, Halstead SB. Neutralizing antibodies after infection with Dengue 1 virus. *Emerg Inf Dis.* 2007;13:282-286
113. Sierra B, García G, Pérez AB, Morier L, Rodriguez R, Alvarez M, Guzman MG. Long term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Inf Dis.* 2002; 6: 125-128
114. Martínez E, Kourí G, Guzmán MG, Paradoa M, Ayllon L. Algunos factores individuales de riesgo en la Fiebre Hemorrágica de Dengue. *Arch Dominicanos Pediatr.* 1988; 24:75-78
115. Ayllon L, Martínez E, Kourí G, Guzmán MG, Paradoa ML. Factores del huesped en la FHD\SCD. *Rev Cubana Pediatr.* 1989; 61: 498-517
116. Agramonte A. Notas clinicas sobre una epidemia reciente de dengue. *Rev Med Cirugia Habana.* 1906; 222-226
117. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana P, Russell K, Sun W, Kanasa-Thanan N, Hayes CG, Watts DM. Haiti: Absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Med Hyg.* 2001; 65: 180-183
118. Morier L, Kourí G, Guzman MG, Soler, M. Antibody dependent enhancement of dengue 2 virus in people of white descent in Cuba. *Lancet.* 1987; 2, 1028-1029
119. Sierra BC, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol Arch Virol* 2007, 152:533-542

120. Sierra BC, Garcia G, Perez AB, Morier L, Alvarez M, Kouri G, Guzman MG. Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral Immunol.* 2006; 19:662-668
121. Guzman MG, Kourí G, Soler M, Bravo J, Rodríguez A, Vazquez S, Muné M. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individuals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 97: 559-564
122. Joseph M, Tonnel A, Torpier G, Capron A, Arnoux B, Benvenist J. Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Clin Invest.* 1983; 71:221-230
123. Koraka P, Murgue B, Setiati TE, Deparis X, Suharti C, van Gorp ECM, Hack CE, Osterhaus ADME, Groen J. Elevated levels of total and dengue virus specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol.* 2003; 70: 91-98
124. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, Hernandez-Pacheco G, Cutino-Moguel T, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2002; 63:1039-44.
125. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, Day NP, Farrar J, Hill AV. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* 2001; 184:1369-73
126. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *Immunol Med Microbiol.* 2006; 47:155-166

127. Guzman MG, Deubel V, Rosario D, Marrero M, Sariol C, Kourí G. Partial nucleotide and amino acid sequence of the envelope and E\NS1 gene junction of 4 dengue 2 strains isolated during the 1981 DHF\DSS Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52: 241-246
128. Alvarez M, Guzmán MG, Rosario D, Vázquez S, Pelegrino JL, Sariol C, Kourí G. Secuenciación directa a partir de un producto amplificado de una muestra de suero. *Rev Cubana Med Trop.* 1996; 48: 53-55.
129. Sariol C, Pelegrino JL, Martínez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship in seventeen-year old paraffin embedded samples of Cuba. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 994-1000
130. Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *CIMID.* 2004; 27: 319-330
131. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 1990; 147: 479-493
132. Guzman MG, Kourí G. Advances in the molecular epidemiological studies on dengue viruses. *Arch Venezolanos Med Trop.* 1998; 1: 1-19 1998.
133. Chungue E, Cassar O, Drouet MT, Guzman MG, Laille M, Rosen L, Deubel V. Molecular epidemiology of dengue 1 and dengue 4 viruses. *J Gen Virol.* 1995; 76: 1877-1884
134. Rodríguez Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Rosario D, Halstead S, Kourí G, Gould EA, Guzman MG. Dengue type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in viruses isolated at different times during the epidemic. *Arch Virol.* 2005; 150:415-425

135. Rodríguez Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Holmes EC, Halstead S, Kourí G, Gould EA, Guzman MG. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. *Virology*. 2005; 334:154-59.
136. Guzman MG, Rosario D, Muné M, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G. Relaciones genéticas de los virus dengue 3 aislados durante la epidemia de FHD de Nicaragua de 1994. *Rev Cubana Med Trop*. 1996; 48: 114-117
137. Rodríguez Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Halstead S, Kourí G, Gould EA, Guzman MG. Dengue virus type 3 in Cuba: Evolution from a Small Outbreak in 2000 to a Major Epidemic in 2001. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11:773-774
138. Camacho DE, Guzmán MG, Morier L, Alvarez M, Rodríguez R, Comach G. Estudio de algunas propiedades biológicas de 3 cepas de dengue 2 con diferencias en sus secuencias nucleotídicas. *Rev Cubana Med Trop*. 1999; 51: 177-180
139. Guzmán M, Kouri G, Bravo J, Silva C, Vazquez S. Encuesta serológica nacional a virus dengue. *Rev Cubana Med Trop*. 1984; 36: 124-131
140. Bravo J, Guzmán M, Kouri G. Encuesta seroepidemiológica retrospectiva a virus dengue en el municipio Cerro. *Metodología*. *Rev Cubana Med Trop*. 1985; 37: 259-268
141. Guzman MG, Kourí G, Halstead SB. Do escape mutants explain the rapid increase in dengue case fatality rates? *Lancet*. 2000; 355: 1902-19003
142. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 40:444-451.

143. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, Rothman AL, Libraty DH. 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 Inf Dis.* 2004; 189:990-1000
144. Guzmán M, Kouri G, Soler M, Morier L, Vazquez S. Aislamiento del virus dengue 2 en sueros de pacientes utilizando el ratón lactante y cultivo de células LLCMK2. *Rev Cubana Med Trop.* 1984; 36: 4-10
145. Soler M, Guzmán M, Morier L, Kouri G. Utilización de los anticuerpos monoclonales para la identificación mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de varias cepas de dengue aisladas durante la epidemia de FHD. *Rev Cubana Med Trop.* 1985 ; 37: 246-251
146. Guzman MG, Vazquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 2002; 54: 180-188
147. Guzman MG, Kourí G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagnostic Immunol.* 1996; 3: 621-627
148. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Guzman 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; 38:3508-3510
149. Rosario D, Suarez C, Rodríguez R, Soler M, Guzman MG. Identificación rápida de los serotipos del dengue mediante PCR. *Rev Cubana Med Trop.* 1996; 48: 155-160
150. Rosario D, Alvarez M, Díaz J, Contreras R, Vázquez S, Rodríguez R, Guzman MG. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples

- using Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction . Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 1998; 4: 1-5.
151. Guzman MG, Rosario D, Kouri G. Diagnosis of dengue virus infection. In: Molecular Biology of the Flavivirus. Ed: M. Kalitzky, P. Borowski. Horizon Bioscience, Norfolk NR180JA, UK, pp191-223, 2006.
152. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodríguez AJ, González E, Frontela MC, Guzman MG. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. Rev Cubana Med Trop. 1997; 49: 100-107.
153. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in Tissues from Fatal Dengue Shock Syndrome. J Clin Virol. 2007; 40:50-54
154. Kourí G, Guzmán M, Bravo J. Criterios utilizados durante la epidemia del DH para definir los casos positivos y las respuestas primarias y secundarias en la prueba de IH. Rev Cubana Med Trop. 1983 ; 35: 4-10
155. Kourí G, Guzmán M, Bravo J, Calunga M. Actividades del laboratorio de Arbovirus durante la epidemia de dengue. Rev Cubana Med Trop. 1982; 34: 107-113
156. Balmaseda A, Guzmán MG, Robleto G, Flores C, Tellez Y, Videá E, Perez L, Saldoval E, Rodriguez Y, Harris E. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific IgM and IgA antibodies in serum and saliva. Clin Diagnostic Lab Immunol. 2003; 10: 317-322
- ^{157.} Guzmán MG, Kourí G, Bravo J, Soler M, Martínez E. Sequential infection as risk factor for DHF\DSS during the 1981 DH Cuban epidemic. Mem Inst *Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 367

158. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzmán MG (2006). Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of some factors. *Dengue Bulletin WHO*. 2005; 29:49-57
159. Bernardo L, Yndart A, Vázquez S, Morier L, Guzmán MG. Antibody Response to Asian and American Genotypes of dengue 2 virus in Immunized Mice. *Clin Diagnostic Lab Immunol*. 2005; 12: 361-362
160. Alvarez M, Valdés D, Vázquez S, Delgado I, García S, Morier L, Guzman MG. Normalización de la técnica de reducción de placas para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla. *Rev Cubana Med Trop*. 1998; 50: 177-181.
161. Laferté J, Pelegrino JL, Guzmán MG, Gonzalez G, Vazquez S, Hermida C, Rivas M, Roges G. Rapid diagnosis of dengue virus infection using a novel 10ul IgM antibody capture ultramicroELISA assay (MAC UMELISA Dengue). *Adv Modern Biotechnol*. 1992; 1:19.4.
162. Rosario D, Alvarez M, Vazquez S, Amin N, Rodríguez R, Valdés K, Guzmán MG. Application of Molecular Methods to the diagnosis and characterization of a dengue outbreak in Cuba. *Rev Biotecnología Aplicada*. 2001; 18: 1-4
163. Hermida C, Pupo M, Guzmán MG, Gonzalez M, Marcet R. Empleo de un anticuerpo monoclonal anticomplejo dengue en la purificación viral. *Rev Cubana Med Trop*. 1992; 44:171-176
164. Evaluación del Programa de Control del Dengue y el Dengue Hemorrágico. Informe Misión Comisión Evaluadora de la OPS a Colombia. Informe Técnico de la OPS. Guzman MG, Campos C, Gil E, Octubre 1995.

165. OPS. Evaluación Programa de Control del Dengue y Dengue Hemorrágico, Guatemala, 1994, OPS. Guzmán MG, Suarez MF, Campos C, Lloyd L, Bañuelos A. OPS/HPC/HCT/94.047, 1994.
166. Guzmán MG, Martinez E, Rigau J, Bown D, Pinheiro F. Informe de asesoría especial sobre la epidemia de dengue hemorrágico en Nicaragua. 29 de noviembre al 11 de diciembre, 1994.
167. Departamento Virologia IPK. Pruebas de Proficiencia Serológica para el Dengue. Boletín Epidemiológico OPS. 1997; 18:9-10
168. Guzman MG, Pelegrino JL, Pumariega T, Vazquez S, Kouri G, Arias J. Control de Calidad Externo del Diagnóstico Serológico de Dengue, 1996-2001. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 2003; 14: 371-376
169. Quiroz E, Ortega M, Guzman MG, Vazquez S, Pelegrino JL, Campos C, Bayard V, Vazquez M, Kouri G (1997). Dengue en Panamá, 1993. Rev Cubana Med Trop. 1997; 49: 86-93
170. Kourí G, Valdez M, Guzman MG, Valdes L, Soler M, Bravo J. Epidemia de Dengue en Nicaragua. Rev Ins Med Trop Sao Paulo. 1991; 33: 365-371
171. Guzmán MG, Huelva G, Saenz E, Quiroz E, Reyes J, Balmaseda A, Gonzalez A, Kouri G. Reintroducción del dengue 3 en las Américas, 1994-1996. Arch Venezolanos Med Trop 1998; 2: 8-19.
172. Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzman MG. Detección de IgM contra el virus dengue en sangre total absorbida en papel de filtro. Rev Panam Salud Publica. 1998; 3: 174-178
173. Gubler D, Clark G, Guzmán MG, Travassos A, Vorndam V, Souza ML, Strugo AH, Yamada MS, Camarra GNL, Pastón H, Campione J, Pinheiro F. Report of

- Meeting of Dengue Laboratories in the Americas, Rio de Janeiro, Brazil. PAHO/HCP/HCT/93/97. October 8, 1996.
174. Scientific Working Group. Report on Dengue. 1-5 October 2006, Geneva, Switzerland. TDR/SWG/07
175. Farrar J, Focks D, Gubler D, Barrera R, Guzmán MG, Simmons C, Kalayanaroj S, Lum L, Ms Call P, Lloyd L, Nathan M, Kroeger . Towards a global dengue research agenda. *A. Trop Med & Int Health* 2007, 12:695-699
176. Guidelines for the evaluation of dengue vaccines in populations exposed to natural infection. TDR/IVR/DEN/02.1
177. Guzman MG. Avances para la obtención de una vacuna para el Dengue. *Acta Científica Venezolana*. 1998; 49: 38-45.
178. Alvarez M, Guzman MG, Pupo M, Morier L, Bravo J, Rodriguez R. Study of some biological attributes of Cuban Dengue 2 virus after serial passage in primary dog kidney (PDK) cells. *Int J Inf Dis*. 2001; 5: 35-39.
179. Guzman MG, Rodríguez R, Rodríguez-Roche R, Hermida L, Alvarez M, Lazo L, Mune M, Rosario D, Valdes K, Vazquez S, Martinez R, Serrano T, Paez J, Espinosa R, Pumariega T, Guillen G. Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69: 129-134
180. Mune M, Rodriguez R, Soto Y, Rodriguez Roche R, Marquez G, Garcia J, Guillen G, Guzman MG. Carboxyl terminally truncated dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris* induced neutralizing antibodies and resistance to dengue 4 virus challenge in mice. *Arch Virol*. 2003; 148: 2267-2273.

181. Hermida L, Bernardo L, Martin J, Alvarez M, Prado I, Lopez C, Sierra B, Martinez R, Rodriguez R, Zulueta A, Perez AB, Lazo L, Rosario D, Guillen G, Guzman MG. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine*. 2006; 24: 3165-3171
182. Valdes L, Vila J, Guzman MG. Impacto económico de la epidemia de dengue 2 de Santiago de Cuba, 1997. *Rev Cubana Med Trop*. 2002; 54: 220-227.
183. Guzman M G, Triana C, Bravo J, Kouri G. Estimación de las afectaciones económicas causadas como consecuencia de la epidemia de dengue hemorrágico ocurrida en Cuba en 1981. *Rev Cubana Med Trop*. 1992; 44: 13-17
184. Von Allmen SD, Lopez-Correa RH, Woodall JP, Morens DM, Chiriboga J, Casta-Velez A. Epidemic Dengue Fever in Puerto Rico, 1977: a cost analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1979; 28: 1040-1044
185. Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI Dengue. *Rev Infect Dis*. 1984; 6: 251-264
186. Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/Dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res*. 1999; 53: 35-70