

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LA INFECCIÓN
POR DENGUE EN ESCOLARES DE MEDELLÍN, ANTIOQUIA, COLOMBIA

Autor: Leidy Diana Piedrahita Espinosa

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO BIOLOGÍA
Medellín
2016

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, VIROLÓGICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LA INFECCIÓN
POR DENGUE EN ESCOLARES DE MEDELLÍN, ANTIOQUIA, COLOMBIA

Autor: Leidy Diana Piedrahita Espinosa

PROYECTO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TÍTULO
DOCTORADO EN BIOLOGÍA

Director: Gabriel Bedoya, Biólogo, MSc

Comité tutorial: Berta Nelly Restrepo MD, MSc
Francisco Javier Díaz MD, PhD
Willy Berlier PhD

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO BIOLOGÍA
Medellín
2016

Nota de aceptación

Firma Director

Firma del Jurado

Firma del Jurado

A mi esposo y mi familia
He aquí el producto de su apoyo incondicional

Agradecimientos

A la Doctora Berta Nelly, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia y delicadeza, por enseñarme que un buen investigador se debe ser una persona íntegra y con valores.

Al Profesor Francisco Díaz por su tiempo y dedicación para enseñarme y contagiarme de su pasión por la virología.

Al Profesor Gabriel Bedoya por permitirme entrar al programa de doctorado y revelarme la esencia de hacer ciencia.

A la familia ICMT por permitirme entrar y ser parte de ella, son un equipo de trabajo fenomenal, gracias por enseñarme que la investigación no tiene sentido si no es con el objetivo de ayudar a los más necesitados de nuestro país.

A las Instituciones educativas y su personal directivas y profesores que nos abrieron sus puertas para la ejecución del proyecto.

A los amigos que siempre estuvieron para dar apoyo y que siempre estarán a pesar de la distancia.

A mi familia por su amor, comprensión y apoyo incondicional durante este proceso.

Finalmente a mi esposo porque sin el nada de esto hubiese sido posible.

Muchas Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xvi
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
JUSTIFICACIÓN	16
Pregunta de Investigación	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos	17
Plan de Análisis	18
Aspectos Éticos	18
MARCO TEÓRICO	19
Virus Dengue.....	19
Ciclo de Replicación	19
Diversidad Genética	21
Ciclo de Transmisión del virus.....	23
Espectro Clínico de La Enfermedad por virus dengue	25
Factores asociados a la presentación del dengue severo.....	26
Respuesta inmune del huésped al virus	28
Diagnóstico	29
Epidemiología	31
CAPÍTULO 1	33
INCIDENCIA Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCION POR DENGUE EN UNA COHORTE DE ESCOLARES CON SINDROME FEBRIL.....	33
Metodología.....	33
Tipo del estudio	33
Población de estudio.....	33
Área de estudio.....	34
Técnicas de Laboratorio.....	35
Resultados.....	38
Presentación clínica de los casos de infección aguda por dengue comparado con otros síndromes febriles	41

Presentación clínica de los casos de infección aguda por dengue comparando los grupos de edad pediátricos	46
Presentación clínica de los casos de dengue por infección primaria y secundaria	53
Descripción de los serotipos circulantes.....	53
CAPÍTULO 2	54
EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS COMERCIALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA POR DENGUE ..	54
CAPITULO 3	76
ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG CONTRA EL VIRUS DENGUE.....	76
Metodología.....	76
Resultados.....	78
Punto de corte	78
Validación.....	81
CAPITULO 4	82
CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA FRENTE AL VIRUS DENGUE Y ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN ESCOLAR DE MEDELLIN.....	82
Metodología.....	82
Diseño del estudio	82
Población de estudio.....	82
<i>Selección de la muestra</i>	82
Técnicas de laboratorio.....	83
Detección de anticuerpos IgM e IgG.....	83
Resultados.....	85
Frecuencia de escolares con presencia de anticuerpos IgM contra el virus dengue años 2010-2012.....	85
Frecuencia de escolares con presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue años 2010-2012.....	87
Seroconversión de anticuerpos IgG en muestras pareadas de escolares periodo 2010-2011 y 2011-2012	91
Caracterización de la respuesta de anticuerpos contra el virus dengue mediante el ensayo de microneutralización en placa adaptado a elispot: ELISPOT-MNT50.....	93
CAPITULO 5	98
ESTUDIO ENTOMÓLOGICO EN LAS VIVIENDAS DE LOS ESCOLARES, LAS IE Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS CASOS DE DENGUE	98
Metodología.....	98

Índices de infestación por <i>Aedes aegypti</i>	98
Sistema de información geográfica.....	99
RESULTADOS.....	100
Distribución espacial de los casos	100
Estudio serológico en contactos familiares de los escolares	104
CAPITULO 6	105
CONOCIMIENTOS, APTITUDES Y PRÁCTICAS SOBRE DENGUE EN ACUDIENTES DE LOS ESCOLARES	105
Metodología.....	105
Diseño del estudio	105
Población de estudio.....	105
RESULTADOS.....	106
Caracterización sociodemográfica de los encuestados	106
Conocimientos	106
Actitudes.....	108
Prácticas.....	108
CAPITULO 7	115
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS DENGUE SEROTIPO 1 AISLADOS DE QUIBDÓ-CHOCÓ Y DE MEDELLÍN Y SU ÁREA METROPOLITANA	115
Metodología.....	115
Descripción del origen de las secuencias.....	115
Técnicas moleculares	115
Alineamiento y secuencias.....	116
Análisis Filogenético.....	116
Resultados.....	117
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	120
EQUIPO DE TRABAJO	130
ENTIDADES FINANCIADORAS.....	131
ENTIDADES PARTICIPANTES.....	131
REFERENCIAS.....	132
ANEXOS.....	145
ANEXO 1. Consentimiento y Asentimiento informado.....	145
ANEXO 2. Formulario clínico y de seguimiento	152

ANEXO 3. Formulario estudio serológico anual154

ANEXO 4. Lista de primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen de la envoltura del virus
DENV-1155

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los resultados positivos de las pruebas usadas para el diagnóstico de dengue en una cohorte escolares con síndrome febril de Medellín durante el 2010-2011

Tabla 2. Características sociodemográficas de la cohorte de escolares con infección aguda por dengue y otros síndromes febriles de Medellín, Colombia.

Tabla 3. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en un cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Tabla 4. Comparación parámetros fisiológicos entre los casos de infección por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en un cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Tabla 5. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase convaleciente, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Tabla 6. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los grupos de edad escolar y adolescente en los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Tabla 7. Comparación parámetros fisiológicos entre los grupos de edad escolar y adolescente en los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en un cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Tabla 8. Comparación Signos y síntomas entre los grupo de edad escolar y adolescente de los casos de infección aguda por dengue, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Tabla 9. Comparación parámetros fisiológicos entre los grupo de edad escolar y adolescente de los casos de infección aguda por dengue, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Tabla 10. Descripción conglomerados por análisis k-medias para cada uno de los lotes en la estandarización de la ELISA indirecta.

Tabla 11. Descripción de la Sensibilidad y Especificidad de cada lote para la ELISA IgG indirecta.

Tabla 12. Características sociodemográficas de los escolares con presencia de anticuerpos IgM contra el virus dengue para los años 2010, 2011 y 2012 en la ciudad de Medellín.

Tabla 13. Características sociodemográficas de los escolares y presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue para los años 2010, 2011 y 2012 en Medellín.

Tabla 14. Porcentaje de seroconversión y seroreversión de anticuerpos IgG contra el virus en escolares de Medellín durante los periodos 2010-2011 y 2011-2012.

Tabla 15. Descripción respuesta inmune contra el virus dengue por MNT50 en escolares de la ciudad de Medellín durante los años 2010, 2011, 2012.

Tabla 16. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación a quien responde.

Tabla 17. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación al grupo de edad

Tabla 18. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación al nivel educativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los síndromes febriles y los casos de infección aguda por dengue en una cohorte de escolares de Medellín durante 2010-2011.

Figura 2. Diagrama de cajas con la distribución de los conglomerados en cada lote según el porcentaje de positividad para la estandarización de la ELISA indirecta

Figura 3. Frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue por edad en los años 2010, 2011, y 2012 en escolares de Medellín

Figura 4. Título MNT50 de los serotipos del virus dengue en escolares de la ciudad de Medellín durante los años 2010, 2011, 2012

Figura 5. Mapa de Medellín con la ubicación de escolares positivos para la infección dengue y los índices de depósito de sus viviendas, 2010.

Figura 6. Mapa de Medellín con la frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue de escolares en las comunas de la ciudad de Medellín año 2010

Figura 7. Árbol consenso por mayoría producto del análisis bayesiano del gen de la envoltura de DENV-1

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento y Asentimiento informado

ANEXO 1. Formulario clínico y de seguimiento

ANEXO 2. Formulario estudio serológico anual

ANEXO4. Tabla de lista de primers utilizados para la secuenciación del DENV-1.

ANEXO 5 Tabla 7. Información secuencias del DENV-1 utilizadas en el análisis filogenético

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN: ácido ribonucleico.

CAP: conocimientos, aptitudes y prácticas.

DENV: virus dengue (*dengue virus*).

DENV-1- DENV-4: virus dengue serotipo 1, 2, 3, 4.

DH: dengue hemorrágico.

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

ELISPOT: ensayo de puntos por inmunoadsorción unido a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT*).

ELISPOT-MNT: ensayo de microneutralización adaptado a un ensayo de puntos por inmunoadsorción unida a enzimas.

ELISPOT-MNT50: título del suero donde se reduce el 50% de las placas por ensayo de microneutralización adaptado a un ensayo de puntos por inmunoadsorción unida a enzimas.

ESE: estrato socioeconómico.

GPS: Sistema de Posicionamiento Global (*Global Positioning System*).

IE: institución educativa.

INS: Instituto Nacional de Salud.

ICMT: Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

MAC-ELISA: ensayo de captura por inmunoadsorción ligado a enzimas (*capture enzyme-linked immunosorbent assay*).

MNT: ensayo de microneutralización (*microneutralization test*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

OSF: otro síndrome febril.

PRNT: Ensayo de neutralización por reducción de placa (*Plaque reduction neutralization test*).

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*).

SIG: Sistemas de Información Geográfica.

RESUMEN

El dengue es una enfermedad febril aguda, causada por un arbovirus de la familia Flaviviridae, posee cuatro serotipos antigénicamente relacionados, es transmitido de persona a persona principalmente por zancudos del género *Aedes*. Es la arbovirosis más prevalente en humanos y contribuye uno de los mayores problemas de salud pública en los países de la región tropical y sub-tropical. En Colombia en el año 2010 se presentó la más grave epidemia de dengue de todos los tiempos. En el país, los grupos más vulnerables y con mayor mortalidad por dengue y dengue grave son los menores de 15 años (1). Sin embargo, no se ha estudiado la frecuencia de esta infección en la población infantil, razón por la cual se realizó este estudio, para mostrar la incidencia, la frecuencia de infecciones asintomáticas y sintomáticas, cuantificar el número de escolares que han estado expuestos al virus, describir aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad e igualmente con la utilización de los sistemas de información geográfica conocer la ubicación geográfica de los casos y determinar zonas de riesgos.

En tres instituciones educativas (IE) de Medellín, se realizó un estudio de cohorte durante dos años para la vigilancia activa de síndromes febriles. Se realizó diagnóstico de dengue y se analizaron las características clínicas. Además cada año durante dos años, en siete IE, se realizó un monitoreo serológico para determinar exposición previa y reciente al virus del dengue. También se visitaron viviendas de algunos escolares para observar la presencia de criaderos del mosquito y determinar su ubicación geográfica. Adicionalmente se realizó un estudio de conocimientos aptitudes y prácticas en los acudientes de los escolares participantes. En el estudio de cohorte participaron 2379 escolares. Durante el tiempo de estudio 264 escolares presentaron fiebre y de estos 41 (13,8%) tuvieron dengue el 90,3% correspondía a infecciones secundarias. Todos los casos fueron clasificados como casos de dengue. Tres de los serotipos del virus del dengue fueron detectados. Se observó pobre desempeño de los estuches disponibles comercialmente para el diagnóstico de infección aguda y secundaria por dengue en esta población. El estudio serológico anual en siete IE, mostró una frecuencia de anticuerpos IgM para el 2010 del 3,0%; para el 2011 del 0,4% y para el 2012 del 3,2% ($p < 0,05$). La prevalencia de anticuerpos IgG aumentó significativamente en cada año, el en 2010 fue del 54,6%; en el 2011 del 59,3% y en el 2012 del 64,7% ($p < 0,05$). Se encontró la presencia de larvas del mosquito que transmite el dengue en el 28,7% de 94 viviendas de los escolares y en todas las IE. Los resultados demuestran que la infección por el virus del dengue es frecuente en la población escolar. Los resultados sobre CAP sugieren que los acudientes de los escolares poseen un adecuado nivel de conocimiento sobre la enfermedad y que está acorde con las actitudes y prácticas dirigidas a reducir su incidencia, sin embargo, una baja proporción se dedicaba a prácticas preventivas

positivas. Los resultados presentados en el presente estudio son importantes para orientar las medidas de prevención y control en zonas de mayor riesgo. Este estudio fue el primero en realizarse en Colombia con la metodología de seguimiento de cohortes y monitoreo serológico en escolares, una población que se puede considerar “centinela” de lo que puede estar pasando en la comunidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es una enfermedad febril aguda, causada por un arbovirus que pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, posee cuatro serotipos antigénicamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (2) los cuales son transmitidos de persona a persona por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. (3–5).

El dengue es la arbovirosis más prevalente en humanos y contribuye el mayor problema de salud pública en los países de la región tropical y sub-tropical (6). La OMS estima que existen 2,5 billones de personas que viven en 112 países endémicos en riesgo de contraer la enfermedad y que aproximadamente ocurren en el mundo 50 millones de infecciones anuales (7). En América Latina y el Caribe el mayor reporte de casos nunca antes observado ocurrió durante la década del 2000-2010, con la circulación de los cuatro serotipos. Durante el 2010 fueron reportados en el continente 1.663.276 casos de infecciones por dengue, 50.232 casos severos y 1.185 muertes. Colombia, Brasil y Venezuela fueron los países más afectados con los más grandes brotes (8). En Colombia se reportaron 147.257 casos, 9.755 casos severos y 217 muertes (9). Todos los serotipos fueron identificados (8). Según datos del Instituto Nacional de Salud, en el país durante el año 2010 los promedios de la edad de los casos de dengue y dengue grave fueron 26 años y 22 años, respectivamente, y las edades más frecuente fueron 14 años y 8 años, respectivamente (10).

La infección por dengue puede ser asintomática, no diferenciable de otros síndromes febriles o puede cursar con un amplio espectro clínico, clasificándose tradicionalmente como fiebre por dengue, formas severas de la enfermedad como dengue hemorrágico (DH) o síndrome de choque por dengue (SSD)(11). En 2009 la OMS reevalúa ésta clasificación y actualmente se clasifica como dengue y dengue severo, La primera forma clínica puede o no cursar con signos de alarma: los cuales incluye dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, hepatomegalia dolorosa, somnolencia o irritabilidad, disminución brusca de la temperatura, aumento del hematocrito. El dengue severo puede ser causado por cualquiera de los serotipos (12) y se caracteriza por acumulación de líquidos, severa extravasación plasmática que puede conducir a choque hipovolémico, dificultad respiratoria, hemoconcentración y hemorragias producidas por trombocitopenia, hipotensión, fragilidad vascular y/o compromiso hepático(13).

En Latinoamérica se han realizado estudios de seroprevalencia de la infección por dengue, en los cuales se han reportado seroprevalencias de 44% (14) y 55,4% en Brasil (15); en República Dominicana en menores de 10 años de 56% (16). En Colombia hay reportes de seroprevalencia en Puerto Berrio, Antioquia (65%), Riohacha, Guajira (38,5%) [revisado por (17)]; Medellín (10,7%)

(Restrepo y Cuervo, 1994, datos no publicados); Urabá Antioqueño (59,1%) (17) y en Cáqueza, Cundinamarca (23,3%) (18).

Igualmente en varios países se han realizado estudios de seroprevalencia e incidencia y seroconversión en población escolar como reflejo del comportamiento del dengue en la población infantil y juvenil (19–23). En la ciudad de Medellín se conoce poco sobre la frecuencia de dengue en la población infantil, sus características clínicas y epidemiológicas.

En cuanto a conocimiento que se tiene sobre la frecuencia de la presentación clínica sintomática versus la asintomática de la enfermedad algunos autores reportan que la forma sintomática es menor que las asintomáticas o subclínicas. En Colombia la frecuencia de infecciones asintomáticas en voluntarios sanos ha sido reportada del 6,7 % (24).

Uno de los pilares para el control del dengue es el conocimiento de su magnitud y en la actualidad solo se conoce la incidencia por los datos de consulta médica. Este estudio se realizó para mostrar la incidencia de la enfermedad, la frecuencia de infecciones asintomáticas y sintomáticas, cuantificar el número de escolares que han estado expuestos al virus, describir aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad en la población escolar y con la aplicación de los sistemas de información geográfica, conocer la ubicación geográfica de los casos para determinar los patrones espaciales de transmisión.

Toda ésta información permitirá aumentar el entendimiento de esta enfermedad en Medellín y así contribuir a orientar y mejorar las estrategias de control de la transmisión viral.

Este estudio fue el primero en realizarse en Colombia con la metodología de seguimiento de cohortes, en una población que se puede considerar "centinela" porque refleja lo que está ocurriendo en la comunidad y su acceso es más fácil por estar concentrada.

JUSTIFICACIÓN

Dengue es un problema de salud pública en Medellín, pero la verdadera magnitud del problema es desconocida. Este estudio permitiría conocer la incidencia y seroprevalencia de la enfermedad, las zonas de riesgo de la ciudad, además de describir las manifestaciones clínicas de la enfermedad y la frecuencia de formas asintomáticas y sintomáticas. Estos resultados aportarían a las instituciones de salud y a las autoridades competentes para la planeación de medidas de intervención y de prevención de acuerdo al riesgo.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son las características clínicas, virológicas y epidemiológicas de la infección por dengue en la población escolar de Medellín?

Objetivo General

Caracterizar clínica, virológica y epidemiológicamente la infección por dengue en escolares de Medellín, Antioquia, Colombia.

Objetivos Específicos

1. Estimar la incidencia de la infección por virus dengue en una cohorte de escolares con síndrome febril.
2. Comparar la presentación clínica de los casos de dengue con la de otros síndromes febriles.
3. Describir la presentación clínica de los casos de dengue según infección primaria y secundaria
4. Evaluar la precisión y concordancia de las pruebas diagnóstica comerciales (prueba rápida SD Biotline Dengue dúo y ELISA de captura Panbio IgM e IgG) usadas para el diagnóstico de dengue.
5. Describir los serotipos del virus dengue circulantes en Medellín durante el período del estudio.
6. Describir la evolución y epidemiología molecular de los serotipos aislados.
7. Estimar la proporción total por año de casos sintomáticos y asintomáticos de dengue.
8. Determinar la caracterización serológica, frecuencia de anticuerpos IgM e IgG y tasa de seroconversión de anticuerpos IgG contra el virus dengue en escolares entre los 5-18 años
9. Describir la distribución espacial de casos de dengue utilizando Sistemas de Información Geográfica (SIG)
10. Determinar índices de infestación por *A. aegypti* en las viviendas de los casos positivos, algunos negativos y en la instituciones educativas que participan en el proyecto.
11. Describir algunos factores de riesgo de esta enfermedad en la población estudiada.

Plan de Análisis

La base de datos fue elaborada en Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). El procesamiento de la información se realizó en Statistical Package for the Social Sciences, SPSS (SPSS®, versión 21, Inc.01., Chicago, ILL). A las variables cuantitativas se les calcularon medidas de tendencia central y de dispersión, medidas de posición como mediana y rangos intercuartílicos. A las variables cualitativas se les calcularon medidas de frecuencia absoluta y relativa. La comparación de las variables cualitativas entre grupos se hizo mediante la prueba de Chi² o el test de Fisher cuando los valores esperados eran menores a 5. Para las variables cuantitativas se realizó la prueba t de Student si la distribución era normal o la prueba de Mann-Whitney si la distribución de la variable no era normal. La prueba de normalidad utilizada fue Kolmogorov-Smirnov y en las muestras menores a 30 se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. El nivel de significancia aceptado fue un valor de $p < 0.05$.

Aspectos Éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Se solicitó consentimiento informado y escrito de los padres o responsables y asentimiento informado y escrito de los escolares de 8 o más años de edad (Anexo 1).

MARCO TEÓRICO

Virus Dengue

El virus dengue (DENV) es una partícula esférica de 40-50 nm, compuesta por un núcleo electrodenso rodeado de una bicapa lipídica, es un arbovirus que pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, posee cuatro serotipos antigénicamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) los cuales se subdividen en diferentes genotipos(2). Su genoma es una cadena de ARN mensajero (11kb) que posee una caperuza (CAP) tipo 1 en el extremo 5'- y carece de una cola de poli-A en el extremo-3'. En ambos extremos posee dos regiones no codificantes (UTR 5'y 3') que regulan la traducción y replicación y un único marco de lectura abierto (*ORF, Open Reading Frame*) que codifica por una poliproteína (2,25). Su origen es debatido entre África y Asia, el primero por ser el origen del vector y el segundo por la alta circulación del virus y la presencia de los cuatro serotipos tanto en humanos como en primates no humanos (3).

Ciclo de Replicación

El ciclo de replicación del DENV es un proceso complejo y todavía en investigación. Comienza con la unión del virus, mediado por la glicoproteína de envoltura, a un receptor celular y/o factor de anclaje (26), Se han descrito diferentes receptores y/o factores de anclaje en células humanas y del vector [revisado por (27)], entre ellos: el receptor de laminina en células de hepatoma humano (HepG2) para el DENV-1; el receptor de manosa en macrófago; el ICAM3 (DC-SIGN) en células dendríticas, las proteínas de 37, 54, 58 y 77 Kilodaltons (KDa) de las glándulas salivales de *Aedes aegypti* y las proteínas de 67 y 80 KDa de las células C6/36 para DENV-1 y DENV-4; el heparán sulfato en hepatocitos humanos (HuH-7); la proteína GRP78/BiP en células HepG2; las proteínas de 28, 34 y 43 KDa de células endoteliales (ECV304); la proteína de 100 KDa en células K562 de médula ósea, la proteína de 65 KDa de neuroblastoma, las proteínas de choque térmico HSP90, HSP70 y moléculas asociadas a CD14 de monocitos, las proteínas de 27, 45, 67, 87KDa de macrófagos; la familia de receptores de la fosfatidilserina TIM y TAM en células 293T (28); las proteínas de 67, 80, 48 KDa; la prohibitina y la HSC70 en células C6/36 para el DENV-2; las proteínas de 40 y 70 KDa de células mielocitos (HL60) para el DENV-2 y DENV-3; el receptor de laminina en células C6/36 para el DENV-3 y DENV-4; y las glicoproteínas de 40 y 45 KDa en células C6/36 para el DENV-4 [revisado por (27)]. Además de la interacción con receptores, existe otro mecanismo de entrada para cualquiera de los serotipos y ocurre durante una infección

secundaria, el cual consiste en la opsonización del virus por anticuerpos no neutralizantes que le permiten la entrada del virus a células que expresan el receptor Fc gamma [revisado por (26)]. En cuanto al tropismo, diferentes estudios muestran que las células blanco in vivo de la replicación del virus son las células dendríticas/células de Langerhans, monocitos/macrófagos (29,30), plaquetas, megacariocitos (31), células endoteliales (32), células del bazo, células hepáticas (33). Después de la interacción con su receptor, el virus entra a la célula por diferentes mecanismos. En general para los flavivirus se ha descrito la vía de endocitosis mediada por clatrina [revisado por (34)]. Sin embargo (27) en estudios in vitro realizados con DENV-1 y DENV-2, muestran que la entrada del virus puede variar de acuerdo serotipo y la célula infectante. En células vero por ejemplo el DENV-1 entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina pero independiente de caveolas, mientras que el DENV-2 utiliza una vía no clásica, independiente de clatrina, caveolas o "lipid rafts" pero dependiente de dinamina. Adicionalmente en células C6/36 HT y A549 ambos serotipos utilizan la vía clásica de endocitosis dependiente de clatrina (27). El paso siguiente en el ciclo de replicación de la partícula viral es ser transportada por los endosomas; la acidificación de estas vesículas promueve la fusión de la membrana viral con la del endosoma y la formación de un poro a través del cual el genoma viral tiene acceso al citoplasma de la célula blanco. Allí ocurre la replicación del ARN viral el cual es traducido en una poliproteína la cual es procesada por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (capside C, premembrana/membrana prM y envoltura E) y siete proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) involucradas en la replicación, ensamble y modulación de la respuesta inmune(2). La poliproteína es dirigida al retículo endoplásmico (RE), donde NS1 y el ectodominio de prM y E son traslocados al lumen del RE, mientras que las proteínas C, NS3 y NS5 son localizadas en el citoplasma [revisado por (35)]. El procesamiento de esta poliproteína es fundamental para la replicación del ARN viral. Este proceso es llevado a cabo por señales celulares en el lumen del RE y por la NS3 y su cofactor NS2B que residen en el citoplasma (36). La NS3 es altamente conservada entre los flavivirus; estudios indican que es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. La comparación de su secuencia nucleotídica y los análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y actividad de ARN trifosfatasa [revisado por (35)]. NS1 es una glicoproteína que es transportada dentro del lumen del RE y secretada de la célula infectada; está implicada en funciones de la replicación viral como también en la defensa viral a través de la inhibición de la activación del complemento. NS4A ha sido involucrada en la alteración de la membrana importante para la replicación y NS4B en asistir la replicación viral a través de la interacción directa con NS3; también se ha sugerido que bloquea la transducción de señales que inducen $INF\alpha/\beta$ [revisado por (37)]. Posterior a la replicación del ARN y la traducción de las proteínas, se produce el ensamble de las partículas virales las cuales pueden ser partículas maduras e inmaduras. Las partículas maduras están compuestas de 180 copias de la glicoproteína de envoltura (E) y de la proteína de membrana (M), las partículas inmaduras presentan en su

superficie la glicoproteína E y la proteína de premembrana (prM), la cual es encargada de proteger el virus de la fusión con la membrana de la célula hospedera durante el proceso de transporte en las vesículas del Golgi. Éstas partículas son maduradas a su paso por el aparato de Golgi y su red de membranas, allí la proteína prM es cortada en el residuo N-terminal (pr) por la proteasa celular furina dejando libre la región C-terminal de las partículas virales (M). Finalmente estas partículas son liberadas por exocitosis (38).

Diversidad Genética

Comparado con otros virus con genoma ARN no transmitidos por vectores como el VIH o influenza, el virus dengue posee una baja tasa de sustitución (35) sin embargo muestra una considerable diversidad genética, su importancia en la replicación y patogénesis permanecen desconocidas (39).

DENV-1

El virus dengue serotipo 1 (DENV-1) fue aislado por primera vez en 1943 en la Polinesia Francesa y en Japón, posteriormente fue reportado en Hawái en 1944 y 1945 (4) cinco genotipos han sido descritos desde entonces (I, II, III, IV y V) (40). En 1977 el genotipo V fue reportado por primera vez en el continente americano, causando epidemias que comenzaron en Jamaica, Cuba, Puerto Rico, Paraguay y la mayoría de las Islas del Caribe, subsecuentemente al resto de países de sur, centro y norte América como México en 1979 y en Texas, Estados Unidos en 1980 (8). Sin embargo estudios recientes sobre la historia de transmisión espaciotemporal de los genotipos del virus dengue en América, sugiere a Granada en las Antillas menores como el lugar de origen del DENV-1 genotipo V y la fecha inferida por el ancestro común más reciente sugiere la presencia del genotipo previamente al año que fue reportado por primera vez en el continente, aproximadamente en 1973 (1970-1975) (40,41). Adicionalmente, estos estudios indican que la tasa de sustitución promedio para el DENV-1 genotipo V es $7,77 \times 10^{-4}$ ($6,52-9,08 \times 10^{-4}$) sustituciones/sitio/año (41). Un estudio realizado por Dash y cols. sobre la filogeografía del virus en India, sugiere a éste país como el origen ancestral del genotipo V o cosmopolita con la identificación de múltiples linajes (42). El primer estudio en Colombia sobre la reconstrucción filogenética del DENV-1 sugieren la circulación de los genotipos I y V y de este último la presencia de dos linajes bien definidos en comparación con otros países de Suramérica (40). En contraste con estos resultados, otro estudio realizado en el departamento de Santander sobre diversificación genética del DENV-1, en un periodo de 11 años, encuentra que todos los virus corresponden al genotipo V y que estos virus presentan una diversificación en cuatro linajes temporalmente definidos como: linaje 1 (L1), cepas de 1998; linaje 2 (L2), cepas de 1999, 2001 y 2002; linaje 3 (L3), las de 2004, 2007 y 2008; y linaje 4 (L4), una cepa aislada en 2007 (43).

DENV-2

El serotipo 2 del virus dengue (DENV-2) aislado por primera vez en Nueva Guinea, está filogenéticamente agrupado en cinco genotipos. Asiático 1: incluye la cepa de referencia 16681, aislada en Tailandia de un paciente con enfermedad severa en 1964 (44); asiático 2: incluye la cepa prototipo Nueva Guinea aislada en 1944; el genotipo Americano (AM): incluye cepas de centro, sur América y el Caribe, así como aislados antiguos de Indias y las Islas del Pacífico; el genotipo asiático/americano: comprende dos linajes bien definidos el primero todas las cepas del sudeste Asiático y el segundo por todas cepas de Centro y Suramérica y del Caribe de las últimas 3 décadas; el genotipo cosmopolita ampliamente distribuido en el mundo y data de 1975, su país de origen es probablemente Indonesia y finalmente el genotipo selvático aislado de primates y de humanos de zonas rurales de África y sudeste asiático aledañas al lugar del aislamiento (44).

El genotipo AM se aisló por primera vez en Trinidad en 1954 y estuvo asociado con infecciones leves; posteriormente fue desplazado por el genotipo asiático/americano, el cual se cree que fue introducido en las Antillas Mayores aproximadamente en 1979; posteriormente ocurrió su dispersión a las islas de Caribe y a Suramérica (41), fue reportado por primera vez en 1981 en Cuba. La introducción de éste genotipo causó la aparición por primera vez de casos severos y de las epidemias de dengue hemorrágico en las últimas décadas en el continente (45,46). Los estudios de la reconstrucción filogenética del DENV-2 en Colombia, indican la circulación del genotipo AM entre 1982 a 1988, y la aparición del genotipo asiático/americano y posterior desplazamiento del genotipo AM entre 1992 y 2010. Éste hecho coincide con el primer reporte en el país de dengue hemorrágico, aislado de un paciente de Puerto Berrio, Antioquia, a finales de 1989 y el posterior aumento de casos severos en los años siguientes (40).

DENV-3

El serotipo 3 del virus dengue (DENV-3) ha sido caracterizado por Lancciotti y cols., en cuatro genotipos o subtipos. El subtipo o genotipo I comprende virus de Indonesia, Malasia y Filipinas e islas del Pacífico Sur; el subtipo II comprende aislados de Tailandia; el subtipo III comprende virus de Sri Lanka, India, África, Samoa, México, El Caribe, Centro y Suramérica el genotipo IV con aislados de Puerto Rico y Tahití (47). Existen reportes recientes en la literatura sobre la existencia de un genotipo V de origen Americano, pero su existencia es controversial debido a su similitud con cepas antiguas que circularon en Asia hace más de dos décadas y a su baja tasa de sustitución y baja divergencia a nivel nucleotídico observada entre el aislado prototipo H87 Filipinas de 1956 (48) y los aislados pertenecientes a este supuesto genotipo aislados entre 2003-2005 en Brasil y Colombia (49,50).

La primera detección del DENV-3 en las Américas data de los años 60s y fue detectado hasta 1977 [revisado por(49)]. Posteriormente fue reintroducido en América y es detectado en 1994 en

epidemias en Panamá y Nicaragua; a partir de 1999 es detectado en Suramérica. Estudios recientes calculan que el año de re-introducción para el Subtipo III en América fue 1991 (1989–1992) con una tasa de sustitución $7,4 (5,4–9,1) \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año (51).

En Colombia fue encontrado por primera vez, y por corto tiempo, entre 1975-1977 y reintroducido en el 2001 en Santander [revisado por (52)]. En Medellín ha sido detectado a partir de 1992 y en los años 1998, 2003 y 2007 (51). Los estudios filogenéticos del DENV-3 en Colombia coinciden en la circulación del subtipo III (44,46, 47). Adicionalmente se ha documentado la presencia de tres diferentes linajes de este subtipo que circulan en Suramérica, provenientes de Brasil, Perú y Venezuela, estos dos últimos con circulación en Colombia (51,52).

DENV-4

El dengue virus serotipo 4 (DENV-4) ha sido asociado con epidémicas cíclicas y esporádicas. Fue reportado en América por primera vez en 1981. Estimaciones del ancestro común más recientes indican que el año de introducción ocurrió entre 1978-1980 y el país de origen fue probablemente República Dominicana. Su tasa de sustitución se calcula en $9,7 (7,9-10,6 \times 10^{-4})$ sustituciones/sitio/año (Allicock et al. 2012). Se han descrito cuatro genotipos: el primero comprende cepas de Filipinas, Tailandia, Vietnam, Sri Lanka e India; este incluye la cepa prototipo H241 aislada de un paciente en Filipinas en 1956; genotipo II, cepas de América: (centro y caribe, sur Brasil, Venezuela y Colombia), sudeste Asiático, China, Islas del Pacífico; genotipo III: cepas exclusivamente de Tailandia entre 1997 y 2001 (53) y genotipo IV o selvático, representado por todas las cepas aisladas de monos en Malasia durante los años 70s [revisado por (44)]. En Colombia el virus fue reportado por primera vez en 1982 y desde entonces ha sido aislado en las epidemias de los años 1983, 1995, 2001-2002 y 2009-2010 (1).

Ciclo de Transmisión del virus

Se han reportado dos ciclos de transmisión para el virus, el selvático, que ocurre en las selvas del occidente de África, Vietnam y Malasia [(Revisado por (46))] y comprende primates no humanos como reservorios y diferentes especies de zancudos *Aedes* que habitan la copa de los árboles pero no se ha encontrado que afecte la población humana que habita en los alrededores (3–5) y el ciclo de transmisión endémico-epidémico, que ocurre entre humanos y que es transmitido principalmente por *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. Los virus que afectan a los humanos tiene un origen genético diferentes al de los virus selváticos y se cree que evolucionaron independientemente hace unos miles de años (3–5).

Aedes aegypti es un vector adaptado a áreas urbanas, tiene un origen Africano y es el principal vector del virus dengue. Las hembras presentan una fuerte antropofilia y una marcada tendencia

a múltiples e interrumpidos ciclos de alimentación antes de completar un ciclo gonotrópico. Las larvas y pupas prefieren agua limpia de criaderos artificiales que se encuentran principalmente en áreas urbanas (7)(54).

En Colombia, *A. aegypti* probablemente fue importado de África en los barcos con esclavos que venían a Cartagena. Se identificó su presencia a finales del siglo XIX [Revisado por (1)] y a finales de los años 50s se realizaron campañas de erradicación, el país quedó libre de transmisión vectorial por dos décadas. Sin embargo, en los años 70s ocurre la re-infestación del territorio nacional [Revisado por (1)].

Aedes albopictus se considera el segundo vector más importante del virus del dengue en el continente americano. Se detectó por primera vez en Colombia en 1998 en Leticia (Amazonas) (55), en los últimos años se ha ido expandiendo y se ha encontrado naturalmente infectado con virus del dengue en algunos departamentos del país (1,24,56). Su hábitat se encuentre en los límites de los bosques y se ha adaptado a los ambientes rurales, suburbanos y urbanos, se desarrolla en criaderos naturales y en recipientes artificiales en las áreas urbanas. Se ha identificado como un competente vector en la transmisión experimental de una amplia variedad de arbovirus y alfavirus. Hasta ahora no se conoce el efecto potencial en la transmisión de *Aedes albopictus* y su capacidad vectorial en la carga de la enfermedad por el virus dengue en el país (1,24,56,57).

La medición del factor de riesgo entomológico en la transmisión del virus dengue se realiza tradicionalmente por la magnitud de los recipientes domésticos y peridomésticos con presencia de poblaciones larvarias y estimación de las densidades adultas; adicionalmente mediante la evaluación de datos de macroclima, elevación sobre nivel del mar y distribución geográfica (58). El modelo de capacidad vectorial se utiliza para estudiar la dinámica de las enfermedades transmitidas por vectores, se define como la tasa promedio de inoculaciones que una población de vectores infectados potencialmente llegaría a introducir un solo individuo si todas las hembras estuvieran infectadas [(58), revisado por(59)]. La capacidad vectorial es ampliamente controlada por factores intrínsecos del vector, como su competencia vectorial, sus preferencias por el hospedero, factores genéticos, hábitos alimenticios, la supervivencia de la especie y el tiempo requerido por el virus para desarrollar su infectividad (periodo de incubación extrínseco-PIE). Adicionalmente los factores extrínsecos como la temperatura y humedad influyen la probabilidad de supervivencia diaria y la duración del PIE [revisado por(59)]. Sin embargo, los valores de densidad vectorial correlacionan pobremente con la incidencia de la enfermedad. Estudios demuestran que un mejor indicador entomológico y que se relaciona con la infección del virus dengue en humanos, podría ser la tasa de infección en pool de mosquitos capturados (24). Estudios realizados en el departamento del Valle en Colombia indican que la tasa de infección

muestra diferencias significativas entre periodos epidémicos y post-epidémicos y un aumento en la tasa de infección de mosquitos se asocia con aumento en la tasa de infección en humanos (24).

Espectro Clínico de La Enfermedad por virus dengue

La infección por dengue puede ser asintomática, no diferenciable de otros síndromes febriles o puede cursar con un amplio espectro clínico clasificándose como fiebre por dengue, formas severas de la enfermedad como dengue hemorrágico (DH) o síndrome de choque por dengue (SSD)(11). En 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reevalúa ésta clasificación y actualmente se clasifica como dengue y dengue severo, La primera forma clínica puede o no cursar con signos de alarma: los cuales incluye dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, hepatomegalia dolorosa, somnolencia o irritabilidad, sangrado de mucosas, disminución brusca de la temperatura, aumento del hematocrito con disminución del número de plaquetas. El dengue severo puede ser causado por cualquiera de los serotipos (12) y se caracteriza por severa extravasación plasmática que puede conducir a choque hipovolémico, dificultad respiratoria, hemoconcentración y hemorragias producidas por trombocitopenia, fragilidad vascular y/o compromiso hepático (13). En rara ocasiones puede ocurrir el daño severo a órganos. Se reportado insuficiencia renal, pancreatitis (7), encefalopatía, (60), arritmias, (35), daño miocárdico grave o hasta fatal (61).

En ocasiones puede ocurrir el daño severo a órganos, por ejemplo el compromiso del sistema nervioso central se manifiesta con encefalitis, meningoencefalitis aguda diseminada, síndrome de Guillan-Barré, epilepsia, cuadriparesia hipopotasémica y neuritis óptica; el compromiso cardíaco con miocarditis, arritmias e insuficiencia del miocardio; el gastrointestinal con hepatitis, falla hepática, colecistitis acalculosa, pancreatitis y parotiditis; también se ha observado insuficiencia renal, miositis y rabdomiolisis (62). El compromiso de órganos durante la infección por el DENV puede ocurrir por daño directo del virus o en forma indirecta por las manifestaciones severas de la infección o por mecanismos inmunológicos, como el edema cerebral, falla hepática, hemorragias, hipotensión o choque que lleva a hipoperfusión, (63,64).

La infección comienza con un periodo de incubación de 5 a 7 días, seguido por tres fases: una febril, una crítica y otra de recuperación, la fase febril se caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, náuseas, vómito y brote; las manifestaciones hemorrágicas pueden presentarse en la piel (petequias) o en las mucosas (sangrado de encías, nariz o más severas como melenas y hematemesis) aunque son menos frecuentes (7). Los hallazgos de laboratorio son trombocitopenia, aumento en los niveles séricos de enzimas hepáticas, perfil anormal de los factores de la coagulación, aumento en los niveles de hematocrito y leucopenia (12,65). La fase

crítica comienza en el día 3-7 desde el inicio de los síntomas y coincide con la disminución del pico febril. Los signos y síntomas son el resultado de la extravasación plasmática inducida por el incremento en la permeabilidad vascular. Los pacientes pueden presentar derrames serosos, hipotensión y choque. En los casos severos es posible observar la coagulación intravascular diseminada y daño de órganos. La severidad de la enfermedad depende del grado de extravasación plasmática. La fase de recuperación se caracteriza por la reabsorción de los líquidos del espacio extravascular al intravascular. El paciente comienza a mejorar sus síntomas, recupera el apetito, permanece afebril, el hematocrito es estable y el conteo de plaquetas asciende. En algunos pacientes se observa un brote descrito como “un mar rojo con islas blancas” y puede haber bradicardia. En esta fase, si hubo suministro excesivo de líquidos o transfusión de componentes sanguíneos innecesarios, puede presentarse edema agudo del pulmón o insuficiencia cardíaca congestiva o derrames serosos masivos (7).

Hasta el momento no existe un tratamiento específico para el virus del dengue, sin embargo la detección y prevención temprana de los signos de alarma, junto con la terapia de líquidos adecuada, son la clave para el manejo de los pacientes.

Con relación a la frecuencia de las formas clínicas de la infección por el virus del dengue, hay reportes en los que la formas subclínicas o inaparentes son las más frecuentes (21) contrastando con otros autores (20) que afirman que es semejante la proporción de casos subclínicos o inaparentes y sintomáticos. Estas diferencias son explicadas por varios autores y dependen básicamente del momento en que fueron evaluados los pacientes, la respuesta del individuo, el serotipo circulante y la localización geográfica (66).

Factores asociados a la presentación del dengue severo

Generalmente el dengue severo se caracteriza por extravasación plasmática y anormalidades en la homeostasia. La explicación del mecanismo de patogénesis ha sido un reto para la investigación durante las últimas décadas; factores virales como la virulencia de cepas, el serotipo circulante, carga viral y co-circulación de varios serotipos, factores epidemiológicos como el cambio de patrones de enfermedad de hipoendémico a hiperendémico han sido postulados (41). En América la introducción de las diferentes cepas de DENV desde otras regiones en los últimos años ha sido asociada con la aparición del dengue hemorrágico (46).

El desplazamiento del virus menos virulento que ha sido transmitido en esas regiones y asociado a la enfermedad en su forma leve ha sido descrito para los serotipos DENV-2 y DENV-3. La introducción del genotipo sudeste asiático del DENV-2 está asociado a la aparición de dengue hemorrágico en países de América como Cuba, Venezuela, Brasil, Colombia y México. Este genotipo desplazó el genotipo americano el cual ha estado asociado con enfermedad leve (46).

Este desplazamiento puede estar asociado a una mejor capacidad de replicación y diseminación en el mosquito (59). El genotipo III del DENV-3 ha sido asociado a epidemias de DH en Sri Lanka, oriente de África y América latina (67).

Estudios realizados con aislados virales de DENV-1 han encontrado diferencias en la región de la envoltura, NS1, NS3 y NS5 en cepas de pacientes con choque por dengue (68). En Nicaragua el DENV-1 se ha asociado con incremento en la permeabilidad vascular y el DENV-2 con choque y hemorragias internas (69). En India la circulación de DENV-2 se ha asociado con dolor abdominal, hepatomegalia y con altos niveles de aminotransferasas. La magnitud y duración de la viremia se ha correlacionado con la severidad de la enfermedad en diferentes poblaciones en el mundo (3,70,71). La circulación simultánea de algunos serotipos también ha sido asociada a la presentación severa del dengue (72).

Otro de los factores asociados al dengue severo es la potenciación mediada por anticuerpos (73). El dengue severo puede ocurrir tanto en infección primaria como secundaria, sin embargo existe evidencia de que la existencia previa de anticuerpos contra el virus (debido a la transferencia de anticuerpos materno-fetales o la exposición previa con otro serotipo) puede aumentar la severidad de la enfermedad (73–76). Este hallazgo ha sido documentado en países como Cuba (45,77). La infección primaria con un serotipo produce inmunidad homotípica de por vida (78). En el caso de una infección secundaria, los anticuerpos pre-existentes no neutralizantes se unen a las partículas virales heterólogas (78). Estos complejos de virus-anticuerpos entran a la célula blanco a través del receptor Fc, produciendo la infección de un amplio espectro de células blanco, lo cual conlleva a una alta producción viral (77). La infección a través del receptor Fc suprime la respuesta inmune, favoreciendo la dispersión viral; adicionalmente la respuesta cruzada de células T de memoria generada durante la infección primaria se ha observado exacerbada durante la infección secundaria (79). La activación de estas células desencadena una cascada de citoquinas implicadas en la patogénesis de las formas severas del dengue (80–83).

Otros factores del hospedero se han asociado con la presentación clínica del dengue. La ancestría africana se ha asociado con protección de las formas severas de la enfermedad (84), variantes genéticas que afectan la producción de citoquinas y del sistema antígeno leucocitario humano también han sido involucrados (85). La edad (menores de un año), el estado nutricional (obesos y desnutridos), las enfermedades crónicas de base como asma, diabetes o hipertensión arterial son considerados factores de riesgo de las formas severas de la infección por dengue (86–89).

Respuesta inmune del huésped al virus

En general una persona puede ser infectada tres a cuatro veces con los diferentes serotipos del virus dengue (90). La infección secundaria, definida como la infección secuencial por diferentes serotipos, es un factor de riesgo asociado al desarrollo de la enfermedad en su forma severa (91). Uno de los principales mecanismos de respuesta inmune en dengue es la humoral; los blancos de la respuesta de anticuerpos son la glicoproteínas E, NS1 y prM. En cuanto a la respuesta celular está dirigida principalmente contra las proteínas NS3 y menor medida contra C, prM, E, NS1, NS4b y NS5 (81). La glicoproteína E es el principal componente de la superficie del virus y es el blanco dominante de la respuesta inmune de anticuerpos contra el virus. Estos anticuerpos han mostrado inhibir la unión del virus a la célula blanco y neutralizar la infección viral in vitro. NS1, aunque no es un componente estructural del virus, es también un blanco importante de la respuesta de anticuerpos; estos anticuerpos pueden activar el complemento y provocar lisis mediada por anticuerpos de las células infectadas in vitro [revisado por(81)].

Los anticuerpos IgM anti-dengue, son el primer marcador de la respuesta inmune humoral en aparecer en cantidades detectables hacia el quinto día, estos anticuerpos reducen sus títulos entre 30-90 días desde el inicio de los síntomas o pueden permanecer por varios meses en individuos que residen en lugares de hiperendemicidad (92,93). Estos anticuerpos confieren inmunidad heteróloga de corta duración. En infecciones secundarias, se ha visto que estos anticuerpos pueden estar ausentes o encontrarse en títulos muy bajos tras el aumento exacerbado de anticuerpos IgG (94). Cuando los títulos de IgM han llegado a su pico máximo, aumentan paulatinamente los anticuerpos IgG, estos anticuerpos confieren protección homóloga y permanente que protege de infecciones por el mismo serotipo, y son los responsables del fenómeno del aumento de la infección dependiente de anticuerpos. En el curso de una segunda infección, los anticuerpos IgG, elevan sus títulos al comienzo de los síntomas, permaneciendo elevados durante varias semanas (94).

Otros anticuerpos como la inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina (IgE), desempeñan un papel en la respuesta inmune en la infección por virus dengue. La presencia de anticuerpos IgA anti-dengue a principios de la enfermedad refleja la participación del tejido linfoide asociado a la mucosa. El virus se replica en células de Langerhans y macrófagos; estas células estimulan células inmunes locales para producir IgA (95). Los anticuerpos tipo IgE específicos contra el virus han sido detectados en niveles significativamente más altos en pacientes con dengue comparados con pacientes sanos y a su vez en aquellos que presentan las formas más severas de la enfermedad como hemorragias o choque (96).

El otro mecanismo de respuesta a la infección por virus dengue es la respuesta celular mediada por células T con producción de citoquinas y mediadores inflamatorios (94). Estudios sugieren que la infección por virus dengue produce una predominante respuesta inmune Th1 en las primeras etapas de la infección. Niveles altos del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ) en pacientes con dengue se han correlacionado con la severidad de la enfermedad (97,98). Restrepo y cols en el 2010 realizaron un estudio comparativo donde determinaron niveles en suero de la IL-6; esta citoquina es un importante pirógeno endógeno, participa también en el aumento de la permeabilidad vascular y se le atribuye la mayoría de los síntomas de dengue. Este estudio fue realizado en dos grupos étnicos con diagnóstico de dengue, siendo más altos los niveles en pacientes mestizos comparado con afrodescendientes y con manifestaciones graves de la enfermedad (99).

Diagnóstico

La confirmación por laboratorio de la infección por el virus dengue puede involucrar diferentes aproximaciones diagnósticas que van desde aislamiento del virus, detección de ácidos nucleicos, de antígenos, anticuerpos o la combinación de éstas técnicas. Después de la aparición de los síntomas el virus puede ser detectado en circulación hasta por 4 o 5 días. Durante esta fase el aislamiento viral y la detección de ácidos nucleicos por RT-PCR convencional o RT-PCR en tiempo real puede ser usado como diagnóstico, sin embargo el éxito de la detección va depender de las condiciones de transporte y almacenamiento de la muestra debido a la inestabilidad del ARN viral (7). La sensibilidad de estas técnicas es muy variable. Chua y col en 2011 en Malasia compararon diferentes pruebas diagnósticas en muestras agudas de pacientes con sospecha clínica de dengue. La sensibilidad del aislamiento viral fue 40,5%, de la RT-PCR convencional 48,4% y de la RT-PCR en tiempo real fue 58,9% (100). El desarrollo de éstas técnicas requiere adecuado almacenamiento de la muestra, personal entrenado y laboratorios bien equipados, además de ser más costosa comparado con la utilización de otras técnicas basadas en la detección de anticuerpos o antígenos. Sin embargo estas pruebas son confirmatorias y en estudios de vigilancia epidemiológica son de gran utilidad para determinar el serotipo del virus circulante en la población humana o de mosquitos.

La detección de anticuerpos en respuesta a la infección es el método serológico usado más ampliamente (101). En una infección primaria por dengue, sin previa exposición o inmunización con otros flavivirus como el virus de la fiebre amarilla, el paciente desarrolla una respuesta primaria caracterizada en principio por la producción de anticuerpos tipo IgM. La respuesta de

anticuerpos IgG es detectable en bajos títulos en la primera semana que pueden ir en aumento y ser detectable por meses e incluso años. Durante una infección secundaria, el título de anticuerpos de tipo IgG incrementa rápidamente y es detectable incluso en la fase aguda, pero los niveles de IgM son más bajos que en una infección primaria incluso en algunos casos indetectables dependiendo del método de detección usado (102). El incremento de cuatro veces o más en título de anticuerpos IgG en sueros pareados durante la fase aguda y convaleciente pueden indicar una infección secundaria reciente.

La tipificación de los anticuerpos anti-DENV presenta dificultades debido a la reacción cruzada entre los diferentes serotipos y con otros flavivirus transmitidos por vectores. Russell y Nisalak en 1967 desarrollaron el ensayo de neutralización por reducción de placa (PRNT) (103), el cual es considerado la prueba de oro para la medición de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo del DENV y para hacer inferencias sobre el serotipo infectante, a pesar de que no existe una definición universal para la interpretación del PRNT con este propósito (104). Esta técnica es laboriosa y requiere un laboratorio equipado, lo que hace que sea inadecuada para el diagnóstico rutinario (105). Recientemente, ha sido desarrollado un ensayo de microneutralización en placa (MNT) para superar algunas de las limitaciones del PRNT. Ésta técnica acoplada a un lector ELISPOT, se desarrolla en platos de 96 pozos, el antígeno viral es detectado en las células infectadas por medio de un método de inmunotinción, posteriormente los focos son detectados automáticamente por un lector ELISPOT (106). Ésta técnica sigue siendo inasequible para la mayoría de los laboratorios a nivel mundial; es por eso que el método de rutina para la detección de anticuerpos es la captura de anticuerpos IgM o IgG en un Ensayo Inmuno-Enzimático (MAC-ELISA o GAC-ELISA, respectivamente). El cual han ido cambiando desde la utilización del virus o extractos crudos, antígenos virales inactivados hasta la producción de proteínas recombinantes (proteínas de la Envoltura de los cuatro serotipos) que resulta más económica su producción y presenta menor riesgo biológico (107).

Estudios que han evaluado la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas diagnósticas, Elisas de Captura IgM y formatos de pruebas rápidas desarrolladas por diferentes compañías (108) han mostrados que su sensibilidad varía entre el 21 al 99% y la especificidad entre 77-98%. La ELISA IgM de captura presenta una mejor sensibilidad pero varía entre 61 y 99% dependiendo de la casa comercial que la produzca. La especificidad varía entre 79,9 y 97,8%; mientras que las pruebas rápidas muestran una sensibilidad entre 20,5 a 97,7% y una especificidad entre 76.6-90.9% (109).

Las pruebas IgM anti-dengue poseen limitaciones como la no diferenciación del serotipo infectante y producción de falsos positivos debido a la reactividad cruzada con otros flavivirus o incluso otras infecciones como malaria y leptospirosis (108). En la última década la proteína no

estructural NS1 ha sido identificada como un marcador serológico útil durante las infecciones primarias y secundarias, encontrándose entre 1 a 9 días desde el inicio de los síntomas con un pico entre los días 3 a 5 [revisado por(110)]. La NS1 es una glicoproteína altamente conservada en los flavivirus como dengue, encefalitis japonesa, fiebre amarilla y encefalitis transmitidas por virus [revisado por(111)]. Diferentes pruebas comerciales han sido desarrolladas y su sensibilidad varía entre 37 y 98,9% y la especificidad reportada va de 86,1 a 100% (112).

Estudios realizados con sueros de pacientes de Colombia (111), Vietnam y Malasia (110), utilizando diferentes pruebas comerciales disponibles en formato ELISA y prueba rápida mostraron que la sensibilidad de la prueba se ve significativamente disminuida en muestras tomadas 3 días después del inicio de los síntomas, en infecciones secundarias, infecciones por serotipos 2 y 4 , y en dengue severo (111). Los dos estudios concluyen que la sensibilidad del diagnóstico en fase aguda se incrementa cuando se utiliza en combinación de la detección del antígeno NS1 y de anticuerpos IgM-IgG anti-Envoltura. La combinación de estas pruebas amplía la ventana de detección en las fases tempranas de la infección (110).

Epidemiología

El dengue es la arbovirosis más prevalente en humanos y constituye el mayor problema de salud pública en los países de la región tropical y sub-tropical (6). La Organización Mundial de la Salud estima que existen 2,5 billones de personas que viven en 112 países endémicos en riesgo de contraer la enfermedad y que aproximadamente ocurren en el mundo 50 millones de infecciones anuales (7). Sin embargo estimaciones recientes usando método cartográficos triplica esa cifra indicando que existen aproximadamente 390 millones de infecciones anuales, de las cuales 96 millones son infecciones con algún nivel de severidad (113). La OMS también indica que aproximadamente 500.000 casos de dengue hemorrágico y 22.000 muertes ocurren anualmente. Durante las últimas cinco décadas, la incidencia del dengue se ha incrementado treinta veces (114). En América Latina y el Caribe el mayor reporte de casos nunca antes observado ocurrió durante la década del 2000-2010, con la circulación de los cuatro serotipos. Durante el 2010 fueron reportados en el continente 1.663.276 casos de infecciones por dengue, 50.232 casos severos y 1.185 muertes. Colombia, Brasil y Venezuela fueron los países más afectados con los más grandes brotes. (8,8). En Colombia se registraron 147.257 casos, 9.755 casos severos, para una tasa de incidencia de 345,4 casos de dengue x 100.000 habitantes y 217 muertes, para una letalidad del 2,28% (9). Todos los serotipos fueron identificados (8) con predominio de DENV-2 (44%) y DENV-1 (41%). Los departamentos con mayor número de casos de dengue y dengue grave

durante la epidemia del 2010 en el país fueron, el Valle con 12.595 y 1.201, Antioquia con 5.750 y 294 y Huila con 4.372 y 1.004 casos de dengue y dengue severo, respectivamente. Durante el 2011 el número de los casos de dengue fue 29.389 y 1.303 de dengue grave (10), en el departamento de Antioquia se registraron, ese mismo año 800 casos de dengue y 32 de dengue severo. Para el año 2012 en el país se reportado 26.693 casos de dengue, 911 casos de dengue severo y circulación de los cuatro serotipos (115). En Colombia el dengue es endémico-epidémico con 85% de su territorio en riesgo de transmisión. En la ciudad de Medellín, área de estudio del presente trabajo, los casos de dengue y dengue severo durante los años 2010 fueron 3.655 y 74, en el 2011 fueron 203 y 9 y en el 2012 fueron registrados 273 y 10 casos de dengue y dengue severo, respectivamente (10).

Los factores que han condicionado el aumento de los casos de dengue son múltiples y son el producto de la combinación de varios componentes artificiales y naturales. Entre ellos está el aumento de la densidad poblacional, el desplazamiento de personas a zonas urbanas no planificadas, con precarias condiciones como el suministro inadecuado de agua y saneamiento ambiental (116–119). Barreto y col (2008) indican que ésta falta de suministro de agua hace que las personas la almacenen para su uso y es en el domicilio y peridomicilio los lugares de mayor proliferación del vector, además los utensilios dedicados a la decoración como floreros también son potenciales criaderos del vector (116–119).

El calentamiento global tiene su efecto en el comportamiento de los vectores, el aumento de la temperatura influye en la disminución del período de incubación extrínseco del virus en el mosquito (120), el incremento en las precipitaciones aumenta el número de criaderos y por ende aumenta la densidad de la población del vector [revisado por (121)] . La desinformación, malos hábitos y estrategias de control ineficaces, entre otros han favorecido la conservación de la población del vector que transmite el dengue (120,122–124).

CAPÍTULO 1

INCIDENCIA Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCION POR DENGUE EN UNA COHORTE DE ESCOLARES CON SINDROME FEBRIL

Metodología

Tipo del estudio

Estudio longitudinal prospectivo, descriptivo de cohorte de escolares para monitoreo de síndromes febriles.

Tiempo del estudio: Mayo de 2010 a Noviembre de 2011.

Población de estudio.

La población del estudio se calculó con escolares de preescolar a undécimo grado de una IE oficial y otra no oficial. Se esperaba un 30% de aceptación (2.631) y de estos se esperaba un 5% con ausentismo por síndrome febril para un total de 132 escolares.

Estas instituciones debían cumplir los siguientes criterios:

- Estar en el área urbana y tener baja deserción escolar
- Tener primaria y bachillerato,
- Tener una población de más de 2.000 estudiantes y
- Contar con la aprobación del cuerpo directivo de la institución.

En las IE se realizaría el reclutamiento de los estudiantes de preescolar a 11° grado al inicio del proyecto y al inicio del segundo año. La aceptación en el estudio sería voluntaria con consentimiento informado y escrito de los padres.

Los criterios de inclusión de los escolares eran los siguientes:

- Escolares matriculados en cualquier grado de primaria o bachillerato.
- Consentimiento informado escrito firmado por uno de los padres o acudientes.

Los criterios de exclusión eran:

- Planear su retiro de la IE en los 12 meses siguientes al inicio del estudio (exceptuando los estudiantes de undécimo grado).

Al inicio del proyecto el personal del estudio se reunió con los padres de familia para informar su importancia y la forma como sus hijos podían participar. A los interesados se les entregó el formato del consentimiento informado, para su firma y aceptación para que sus hijos fueran incluidos.

Adicionalmente, se realizó la socialización del proyecto a los profesores para que ayudaran con las labores de captación de casos.

Captación de los participantes y recolección de la información

Durante el tiempo del estudio los casos de infección aguda por dengue eran identificados a través la vigilancia del ausentismo escolar por síndrome febril de 7 o menos días de evolución, documentada con termómetro ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) o por referencia de fiebre por el estudiante o sus padres. Estos escolares eran considerados casos sospechosos de dengue. Una auxiliar de enfermería y un médico del proyecto visitaban las IE cada 3 o 4 días y verificarían el ausentismo de los escolares inscritos en el proyecto ya sea por llamada a lista o por verificación del ausentismo en el listado de asistencia de los profesores o de los alumnos encargados de esta labor. Posteriormente se comunicaba con los padres para indagar la causa del ausentismo.

Criterios de inclusión:

- Estudiantes que aceptaban participar en el estudio y que presentaban fiebre de 7 días o menos de evolución, documentada con termómetro timpánico ($>38^{\circ}\text{C}$) o por referencia de fiebre por el estudiante o los padres.
- Cualquier etiología.
- Cualquier sexo.

En el caso de cumplir con los criterios de inclusión se citaría al escolar a la IE, en donde un médico realizaría un examen médico y auxiliar de enfermería le tomaba una muestra de 5 mL de sangre en la fase aguda, al momento de presentación de la fiebre y otra en la fase convaleciente (14 a 21 días). Adicionalmente, se diligenciaría un formulario con datos clínicos (Anexo 2).

Área de estudio

El estudio se realizó en la ciudad de Medellín, la capital del departamento de Antioquia, ubicada a una longitud de $75^{\circ}34'05''$.752W y latitud $6^{\circ}13'55''$.098N, cuenta con una superficie de 380km^2 , la temperatura media anual es de $22,4^{\circ}\text{C}$. Está dividida en 16 comunas denominadas: 1-Popular, 2-Santa Cruz, 3-Manrique, 4-Aranjuez, 5-Castilla, 6-Doce de Octubre, 7-Robledo, 8-Villa Hermosa, 9-Buenos Aires, 10-La Candelaria, 11-Laureles–Estadio, 12-La América, 13-San Javier, 14-El Poblado, 15-Guayabal, 16-Belén y cinco corregimientos: Palmitas, San Cristóbal, Altavista, San Antonio y Santa Elena (125). Su población se estima 2.464.322 habitantes, el 98,8% habita la

cabecera municipal (2.464.647), de los cuales 509.009 corresponden a la población con edad entre los 5 y 19 años (126). El nivel educativo de la población objeto de estudio está dividido en preescolar (10,17%), primaria (41,17%), bachillerato de sexto a noveno (34,6%) y media decimo y once (14,07%). En la ciudad existen 703 Instituciones Educativas (IE) de las cuales 397 son no oficiales (125).

Técnicas de Laboratorio

Detección del genoma viral

Para la detección del genoma viral se realizó extracción del ARN viral de las muestra de sangre de la fase aguda y de sobrenadante del cultivo, usando el estuche QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) y la identificación del virus mediante RT-PCR siguiendo el protocolo de Lanciotti y adaptado por Harris (127).

Prueba Rápida

Se utilizó la prueba rápida (PR) SD BIOLINE DENGUE DUO (IgG/IgM + NS1 Ag) donadas por el fabricante Standard Diagnostics, (Kyonggi-do, South Korea), para detección de anticuerpos IgM/ IgG y antígeno NS1 en las muestras de fase aguda de los escolares con síndrome febril.

Aislamiento viral

De la cohorte de síndrome febril fueron seleccionadas 41 muestras de fase aguda y se realizó aislamiento viral en células C6/36 de mosquitos *Aedes albopictus* acorde al procedimiento de Gubler et al. 1984, modificado por Guzmán & Kouri 1996. Brevemente, las muestras de suero fueron inoculadas en células C6/36 de *Aedes albopictus* e incubadas a 32°C hasta la aparición de efecto citopático o hasta por 10 días. La detección del virus se realizó por la inmunofluorescencia indirecta previamente descrita (128) o por extracción de ARN viral y RT-PCR para identificación del serotipo. Los virus aislados fueron almacenados en -80°C hasta su procesamiento.

Detección de anticuerpos IgM e IgG

ELISA

Las muestras de suero se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. A las muestras de suero de los escolares con síndrome febril, fue determinada la presencia de anticuerpos IgM e IgG en la fase aguda y convaleciente utilizando los estuches comerciales Dengue IgM e IgG ELISA de captura (Cat N° E-DEN01M; E-DEN02G Panbio, Sinnamon Park, Australia) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

ELISPOT-MNT

El ensayo de microneutralización ELISPOT (ELISPOT-MNT) (106). Se realizó en 41 muestras pareadas de pacientes con síndrome febril. Es una prueba realizada en platos de 96 pozos, donde las unidades formadoras de placas (ufp) se desarrollan en 2-4 días y el antígeno viral en células infectadas es detectado por un método de inmunotinción indirecto. Las células infectadas forman focos que son detectadas automáticamente con un equipo de ELISPOT. El protocolo consiste en resumen, en sembrar células vero en platos de poliestireno de 96 pozos. Los sueros se inactivan a 56°C por 30 min y se realizan diluciones seriadas en base 4 iniciando en 1:20 en medio BA. Los virus se utilizan a concentraciones de 100-200 ufp/pozo, las cepas de referencia usadas fueron: DENV-1 16007, DENV-2 16681, DENV-3 16562 and DENV-4 1036. 50µL de cada dilución de suero se mezcla con 50µL de cada virus y se incuba por 16 horas a 4°C. Después, 50µL de la mezcla (por triplicado) son transferidos a pozos con células vero al 90% de confluencia, se incuban por 2 horas y posteriormente el inóculo es retirado y se adiciona medio semi-sólido que contiene DMEM, suero bovino fetal y carboximethylcellulosa. Se realiza una incubación adicional por 2-3 días dependiendo del serotipo y posteriormente las células son fijadas con formaldehído al 3,7%. Finalmente, se realiza una inmunotinción con anticuerpos policlonales de conejo contra cada uno de los serotipos e incubando toda la noche a 4°C, después se adiciona un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en cabra, unido a la peroxidasa (Thermo Scientific Inc. USA); se incuba por 2 horas a 37°C y se revela la reacción usando el sustrato cromogénico AEC (3-amino-9-ethylcarbazole), los platos son lavados con agua y el conteo de los focos formados en cada pozo es realizado por el analizador automatizado C.T.L inmunSpot® (Cellular Technology Ltd., USA). El título de ELISPOT-MNT50 es definido como la dilución del suero donde se reduce el 50% de las placas cuando se compara con los pozos control que solo poseen el virus. Los títulos de ELISPOT-MNT50 menores a <1:20 se consideraron indetectables.

Definiciones

Caso positivo de infección aguda por el virus del dengue: se definió por la presencia de anticuerpos IgM en la muestra aguda y convaleciente, seroconversión de anticuerpos IgM o IgG o por detección del virus por prueba rápida (antígeno NS1), RT-PCR o por aislamiento viral.

Por MNT-50, la infección aguda por el virus dengue fue definida por aumento cuádruple en el título de anticuerpos entre la fase aguda y convaleciente de una paciente con síndrome febril contra cualquiera de los serotipos.

Infección secundaria o primaria. Se definió según la presencia (infección secundaria) o no (infección primaria) de anticuerpos IgG por Elisa contra el virus del dengue en la muestra de la fase aguda de una caso positivo. Adicionalmente, se utilizaron los valores índice de la ELISA IgM y de la IgG en la muestra convaleciente para determinar el radio IgM/IgG; se definió como infección primaria si el radio era ≥ 1.4 e infección secundaria si el radio era < 1.39 (7).

Por MNT-50 la Infección primaria se definió por la no detección de anticuerpos en la muestra de fase aguda y detección o incremento cuádruple en los títulos de anticuerpos en la muestra de fase convaleciente y la Infección secundaria fueron los casos con títulos detectables de anticuerpos neutralizantes en la fase aguda y posterior aumento en la fase convaleciente.

Casos no reactivos o negativos por MNT-50: aquellos que no evidenciaron título de anticuerpos neutralizantes en ambas muestras.

Infecciones no recientes: determinadas por la presencia de anticuerpos neutralizantes en la fase aguda y convaleciente pero sin cambios o reducción del título de anticuerpos por MNT-50.

Respuesta humoral homotípica o heterotípica: fue definida por respuesta contra uno o múltiples serotipos respectivamente, por el método de MNT (104).

Resultados

La cohorte estuvo constituida en el año 2010 (Mayo a Noviembre) por 2.379 escolares de tres IE, 2 oficiales: IE-SB e IE-IN ubicadas en la Comuna la América y el Poblado, respectivamente, y la IE-UP No Oficial, ubicada en la Comuna de Laureles-Estadio. La población estuvo distribuida así: 984 en la IE-SB, 837 en la IE-IN y 558 en la IE-UP. Los escolares pertenecían el 3,4% al grado de preescolar, el 38,9% a primaria; el 44,5% a bachillerato y el 12,3% a la educación media, es decir, a décimo y undécimo. El 52,8% eran mujeres; el 90,2% se auto-identificaron como mestizos, el 4,5% como afro-colombianos y del 5,3% no se obtuvo ésta información. Todos los estratos socio-económicos (ESE) estuvieron representados (56,2% ESE-Bajo; 36,7 ESE-Medio; 6,9% ESE-Alto). La distribución por edad de los escolares fue 29,2% pertenecían al grupo de 5 a 9 años, el 53,5% al grupo de 10 a 14 años y el 17,3% al grupo de 15 a 19 años.

En el 2011 (Febrero a Noviembre) se observó un deserción del 22,9% en el número de escolares participantes, la cohorte estuvo constituida por 1.835 escolares. No ingresaron nuevos escolares del grado de preescolar, el 35,6% pertenecían a primaria; el 45,7% a bachillerato y el 18,7% a la educación media. La distribución por raza y sexo se mantuvo igual. Los estratos socio-económicos estuvieron representados así: 50,9% del ESE-Bajo, 40,9% del ESE-Medio y 7,9% del ESE-Alto. En la distribución por edad no hubo escolares de 5 años, el 20,4% pertenecerían al grupo entre 6 a 9 años, el 56,2% al grupo de 10 a 14 años y el 23,4% al grupo de 15 a 19 años.

Durante el tiempo de estudio (Mayo de 2010 a Noviembre de 2011) fueron captados 264 escolares con síndrome febril, 31 de los cuales presentaron dos episodios febriles y dos presentaron tres episodios, para un total de 297. El 67,7% (201/297) de los síndromes febriles fueron captados en el año 2010, la frecuencia de síndrome febril en la cohorte de 2010 fue de 8,4% (201/2.379). El resto, 96 pacientes fueron captados en el año 2011, la frecuencia de síndrome febril ese año fue de 5,2% (96/1.835). La mayoría (81,6%) de los síndromes febriles del 2010 se presentaron entre julio-septiembre, mientras que en el año 2011 la mayoría (78,1%) se presentaron entre mayo-agosto. Cuarenta y siete muestras fueron positivas para dengue por alguna o varias de las pruebas realizadas (Tabla 1). Sin embargo en seis de estas muestras se evidenció que no eran infecciones recientes ya que se encontró que las muestras convalecientes se tornaron negativas en la ELISA IgM e IgG y/o se observó descenso en el título de anticuerpos por el MNT-50. En las muestras positivas, en promedio, la toma de la muestra se realizó al cuarto día ($\pm 1,5$) desde el inicio de los síntomas y la muestra convaleciente fue tomada en promedio 15 (± 2) días después del inicio de los síntomas.

Tabla 1. Distribución de los resultados positivos de las pruebas usadas para el diagnóstico de dengue en una cohorte escolares con síndrome febril de Medellín durante el 2010-2011

Prueba Diagnóstica									No. casos	%
RT-PCR _a	Prueba Rápida			ELISA				MNT-50		
	NS1 _a	IgM _a	IgG _a	IgM _a	IgM _c	IgG _a	IgG _c			
POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1	2,1
POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	3	6,4
POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	2	4,2
POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	SD	1	2,1
POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	1	2,1
POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	1	2,1
POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	1	2,1
NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	SD	2	4,2
NEG	POS	NEG	NEG	POS	SD	NEG	SD	SD	1	2,1
NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	1	2,1
NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	2	4,2
NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	1	2,1
NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	1	2,1
NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	1	2,1
NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	SD	2	4,2
NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	SD	5	10,6
NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	SD	1	2,1
NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	1	2,1
NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	SD	1	2,1
NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	9	19,1
TOTAL									47	100

a= resultado de la prueba en la muestra aguda; c= resultado de la prueba en la muestra convaleciente; NEG: Negativo; POS: positivo; SD: Sin dato.

Cuarenta y un casos de infección aguda por dengue fueron confirmados por laboratorio, de los cuales un paciente presentó dos infecciones durante el tiempo del estudio. La mayoría de los casos fueron encontrados en las mujeres y en los mestizos comparado con los hombres y con los afrocolombianos, respectivamente, estas diferencias no fueron significativas. Los casos de infección aguda se observaron en todos los ESE y en todos los grupos de edad (Tabla 2). El promedio de edad en el grupo de otros síndromes febriles (OSF) y en los casos de infección aguda por dengue fueron similar 11,3 (±2,8) y 11,1 (±3,3) respectivamente.

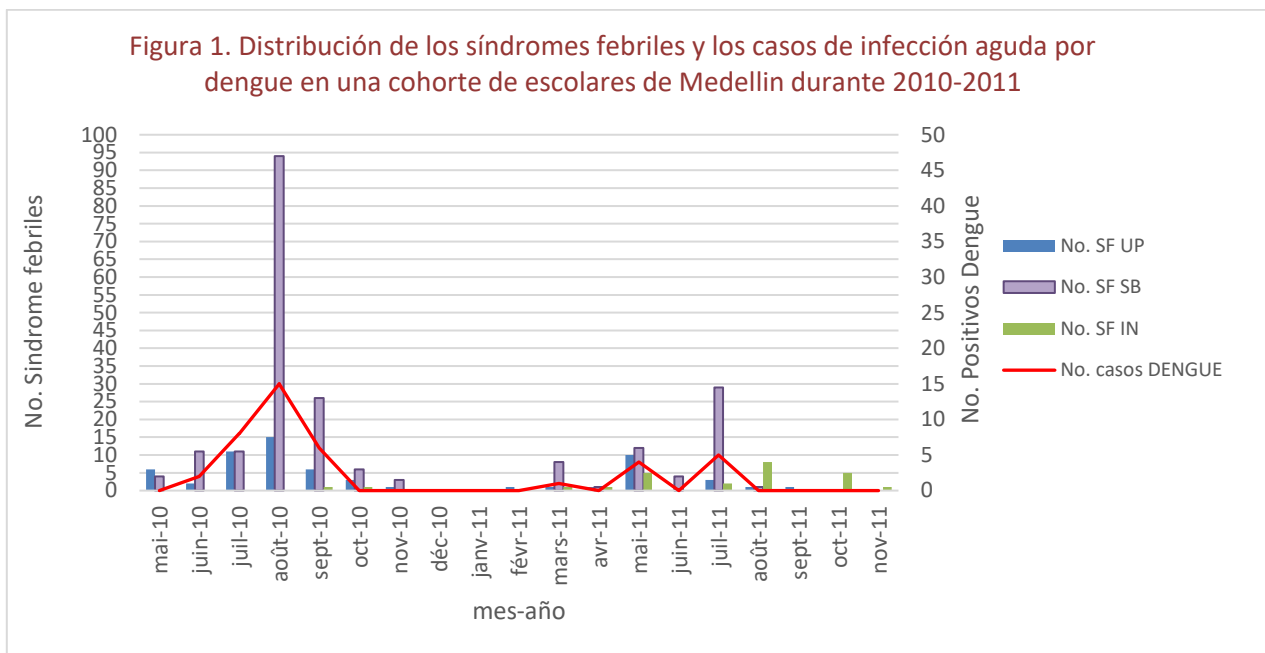
Tabla 2. Características sociodemográficas de la cohorte de escolares con infección aguda por dengue y otros síndromes febriles de Medellín, Colombia.

Características Sociodemográficas	Infección aguda por dengue n=40		Otro síndrome febril n=224		Total n=264	
	No.	%	No.	%	No.	%
Género						
Mujeres	24	14,7	139	85,3	163	61,3
Hombres	16	15,8	85	84,2	101	38,3
Raza						
Mestizo	37	84,3	198	15,7	235	89,0
Afro-colombiano	1	6,4	14	93,3	15	5,7
Estrato Socio-Económico						
Bajo	24	13,8	150	86,2	174	65,9
Medio	12	15,4	66	84,6	78	29,5
Alto	4	10,0	7	63,6	11	4,2
Grupo de Edad (años)						
5-9	12	16,2	62	83,8	74	28,0
10-14	22	14,3	132	85,7	154	58,3
15-19	6	16,7	30	83,3	36	13,6

El 13,8% (41) de las 297 muestras de pacientes con síndrome febril fueron casos de infección aguda por dengue. Treinta y uno fueron encontrados en el año 2010 y diez casos en el 2011, es decir, la frecuencia de casos de infección aguda por dengue fue de 1,3% (31/2.379) y de 0,5% (10/1.835) en la cohorte de escolares durante el año 2010 y 2011, respectivamente. Adicionalmente, la incidencia de casos de infección aguda por dengue en escolares con síndrome febril en el 2010 fue 15,4% [IC95%=10,5—21,9] y en el 2011 de 10,4% [IC95%=5,0—19,2].

La frecuencia de infección aguda por dengue fue mayor en los pacientes con síndrome febril de la IE-UP no oficial (27,3%; 12/44) que en la IE-SB donde fue 12,3% (19/155), ésta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,02$). En contraste, durante el 2011 la IE-SB tuvo la mayor frecuencia de casos de infección aguda por dengue 14,5% (8/55) y en la IE-UP fue de 11,1% (2/18), ésta diferencia no fue significativa. En la IE-IN no se detectaron casos. El 90,3% (28/31) de los casos del año 2010 y todos los casos del 2011 (10/10) fueron Infecciones secundarias

En el 2010 los casos de infección aguda por dengue se presentaron durante los meses de junio-septiembre y en el 2011 en los meses de marzo-julio (Figura 1).



Las barras indican el número de síndromes febriles para cada una de las IE, la línea roja indica los casos agudos de dengue captados en cada mes.

Presentación clínica de los casos de infección aguda por dengue comparado con otros síndromes febriles

Fase Aguda

Todos los casos de infección aguda por dengue fueron clasificados como dengue (7). Sólo un escolar fue hospitalizado, este paciente presentó mareos, vómitos, erupción generalizada, aumento del 14,5% en el hematocrito, la evolución fue satisfactoria. Se realizó una comparación entre los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles (OSF). Los síntomas más frecuentes en los casos de infecciones agudas por dengue y que presentaron una diferencia estadísticamente significativa comparada con OSF fueron: mialgias, artralgias, lumbalgia, brote y prueba del torniquete positiva; también fueron más frecuente la astenia, el eritema en garganta, el dolor de cuello, el enrojecimiento de cara, la anorexia, equimosis, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa. En los casos OSF fueron más frecuentes las petequias en mucosa y las adenopatías cervicales con diferencia estadísticamente significativa. También fueron más frecuentes el dolor de garganta y las manifestaciones hemorrágicas como sangre en heces y en orina esta diferencia significativa (Tabla 3). Otros signos y síntomas que se presentaron en ambos grupos fueron: cefalea, dolor retroocular, conjuntivitis, otalgia; del sistema gastrointestinal:

náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea y estreñimiento; del sistema respiratorio: tos, rinorrea, congestión nasal y la dificultad respiratoria; las manifestaciones hemorrágicas encontradas en ambos grupos fueron epistaxis, hemorragia gingival y metrorragia. En otros parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica y la diastólica no se encontró diferencias entre los grupos (Tabla 4).

Tabla 3. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Signos y síntomas	Infección aguda por dengue n=41		OSF n=252		Total N=293		Valor de p
	No.	%	No	%	No	%	
Estado general							
Astenia	39	95,1	218	85,2	257	87,7	N.S
Mialgia	23	56,1	93	36,3	116	39,6	0,020
Artralgia	22	53,7	77	30,1	99	33,8	0,004
Lumbalgia	22	53,7	59	23,0	81	27,6	0,000
Sistema nervioso							
Depresión	19	46,3	111	43,4	130	44,4	N.S
Parestesia	5	12,2	29	11,3	34	11,6	N.S
Cabeza							
Cefalea	33	80,0	209	81,6	242	82,6	N.S
Dolor retro-ocular	12	29,3	75	29,3	87	29,7	N.S
Eritema en garganta	30	73,2	163	63,7	193	65,9	N.S
Dolor de cuello	15	36,6	72	28,1	87	29,7	N.S
Petequias en mucosa	3	7,3	53	20,7	56	19,1	0,038
Conjuntivitis	2	4,9	14	5,5	16	5,5	N.S
Enrojecimiento de cara	4	9,8	9	3,5	13	4,4	N.S
Otalgia	8	19,5	54	21,1	62	21,2	N.S
Adenopatías cervical	10	24,4	115	45,6	125	42,7	0,011
Síntoma gastrointestinal							
Anorexia	27	65,9	146	57	173	59	N.S
Nauseas	20	48,8	117	45,7	137	46,8	N.S
Vómito	10	24,4	59	23,0	69	23,5	N.S
Dolor abdominal	4	9,8	31	12,1	34	11,9	N.S
Diarrea	6	14,6	39	15,2	45	15,4	N.S
Estreñimiento	5	12,2	25	9,9	30	10,2	N.S
Síntomas Respiratorio							
Tos	25	61,0	168	66,6	193	65,9	N.S
Congestión nasal	25	61,0	163	63,7	188	64,2	N.S
Rinorrea	23	56,1	149	58,2	172	58,7	N.S
Dolor de garganta	22	53,7	148	57,8	170	58,0	N.S
Dificultad respiratoria	7	17,1	49	19,1	56	19,1	N.S
Manifestaciones hemorrágicas en piel							
Brote	5	12,2	5	1,9	10	3,4	0,006

Brote generalizado	4	9,7	2	0,8	6	2,0	0,004
Equimosis	1	2,4	0	--	1	0,3	N.S
Prueba del torniquete Positiva (>10)	10 [£]	25,0	32	12,6	42	14,4	0,039
Manifestaciones hemorrágicas en mucosas							
Hemorragia gingival	2	4,9	11	4,3	13	4,4	N.S
Hemorragia nasal	3	7,3	24	9,4	27	9,2	N.S
Metrorragia	2 [¥]	12,5	14 [¥]	11,5	16	11,6	N.S
Sangre en heces	0	--	6	2,3	6	2,0	N.S
Sangre en orina	0	--	2	0,8	2	0,7	N.S
Dolor al orinar							
	2	4,9	19	7,5	21	7,2	N.S

OSF=Otro síndrome febril; [£]n=40, un caso sin dato; [¥]n=16 en los casos de dengue y n= 122 en los otros casos de síndrome febril. N.S.=estadísticamente no significativo.

Tabla 4. Comparación parámetros fisiológicos entre los casos de infección por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Parámetros fisiológicos	Infección aguda por dengue n=41		OSF n=252		Total N=293	
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Frecuencia Respiratoria*	16	14--18	16	16--18	16	16-18
Pulso ⁺	88	80--97	88	80--97,5	88	80-97
Presión Arterial sistólica	100	90--110	100	90--110	100	90--110
Presión Arterial diastólica	60	60--70	65	60--75	65	60--70

*=Respiraciones por minuto; +=Latidos por minuto.

Fase Convaleciente

Durante la fase convaleciente, se recuperó la información clínica de 265 casos de síndromes febriles de los cuales 39 (95,1%) era casos de infección aguda por dengue y 226 (89,7%) eran OSF. En casos de infección aguda por dengue se encontró un aumento en la frecuencia de los siguientes signos y síntomas con la relación a la fase aguda: Parestesias (de 1,2 a 20,5%), otalgia (de 19,5 a 23,1%), vómito (de 24,4 a 28,2%), diarrea (de 14,6 a 25,6%), dolor de garganta (de 53,7 a 56,4%), dificultad respiratoria (de 17,1 a 25,6%), hemorragia gingival (de 4,9 a 10,2%), hemorragia nasal (de 7,3 a 10,2%) y dolor al orinar (de 4,9 a 12,8%). En los otros síndromes febriles se observó un aumento en la frecuencia de mialgias (de 36,3 a 39,8%), artralgias (de 30,1 a 32,3%), parestesia

(de 11,3 a 13,7%), dolor de cuello (de 28,1 a 30,9%), brote (de 6,6 a 15,9%), hemorragia gingival (de 4,3 a 7,1%) y dolor al orinar (de 7,5 a 8,8%).

Se realizó la misma comparación entre los casos de infección aguda por dengue y los OSF para determinar que síntomas se mantuvieron o aparecieron durante la fase de defervescencia y convalecencia; se observó en los casos de infección aguda de dengue un aumento significativo ($p=0,001$) en la frecuencia de diarrea comparado con los OSF, en cambio la lumbalgia, el dolor de cuello, el estreñimiento, el brote y la sangre en heces fueron más frecuentes en los OSF durante la fase convaleciente, pero esta diferencia no fue significativa (tabla 5). El promedio de días de duración de la enfermedad fue similar entre ambos grupos 5,5 [IC95%=4,4—6,5] en los casos de infección aguda por dengue y 5,4 [IC95%= 4,9—5,9] para los OSF.

Tabla 5. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase convaleciente, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Signos y síntomas fase convaleciente	Infección aguda por dengue n=39		Otro síndrome febril n=226		Total n=265	
	No.	%	No.	%	No.	%
Estado general						
Astenia	30	76,9	151	66,8	181	68,3
Mialgia	19	48,7	90	39,8	109	41,1
Artralgia	18	46,1	73	32,3	91	34,3
Lumbalgia	11	28,2	68	30,1	79	29,8
Sistema nervioso						
Depresión	18	46,1	97	42,9	115	43,4
Parestesia	8	20,5	31	13,7	39	14,7
Cabeza						
Cefalea	27	69,2	149	65,9	176	66,4
Dolor Retro-ocular	11	28,2	63	27,9	74	27,9
Dolor de cuello	10	25,6	70	30,9	80	30,2
Otalgia	9	23,1	47	20,8	56	21,1
Síntomas Gastrointestinales						
Anorexia	24	61,5	125	55,3	149	56,2
Nauseas	17	43,6	86	38,1	103	38,9
Vomito	11	28,2	46	20,	57	21,5
Dolor abdominal	1	2,6	5	2,2	6	2,26
Diarrea	10	25,6*	19	8,4	29	10,9

Estreñimiento	2	5,1	22	9,7	24	9
Síntomas Respiratorio						
Tos	23	58,9	131	57,9	154	58,1
Congestion nasal	22	56,4	115	50,9	137	51,7
Rinorrea	22	56,4	111	49,1	133	50,2
Dolor de garganta	22	56,4	107	47,3	129	48,7
Dificultad respiratoria	10	25,6	44	19,5	54	20,4
Piel						
Brote	0	0,0	1	0,4	1	0,4
Manifestaciones hemorrágicas en mucosa						
Hemorragia gingival	4	10,2	16	7,1	20	7,5
Hemorragia nasal	4	10,2	22	9,7	26	9,8
Metrorragia [¥]	1 [¥]	6,2	7 [¥]	6,4	8	5,8
Sangre en heces	0	--	2	0,9	2	0,7
Dolor al orinar	5	12,8	20	8,8	25	9,4

*= Diferencia estadísticamente significativa valor de $p < 0,05$ [¥]n=16 en los casos de dengue y n= 122 en los otros casos de síndrome febril.

Presentación clínica de los casos de infección aguda por dengue comparando los grupos de edad pediátricos

Debido a la variación fisiológica que se presentan con la edad, para este análisis los participantes se clasificaron en grupos de edad pediátricos definidos por la OMS en Pre-escolar (2-5años), escolar (6-12 años) y adolescente (13-18 años) (129). El promedio de edad en los OSF y en los casos de dengue fue similar 11,7 ($\pm 2,7$) y 11,39 ($\pm 3,2$) respectivamente.

Los casos de infección aguda por dengue estaban distribuidos en los grupos de edad pre-escolares 2,4% (1/41); escolares 56,1% (23/41) y en adolescentes 41,5% (17/41).

Se realizó la comparación con los individuos del grupo de edad escolar que presentaron infección aguda por dengue comparados con los OSF, los resultados indican que la frecuencia de los signos y síntomas evaluadas son similares, exceptuando la frecuencia de lumbalgia que es significativamente mayor en los casos de infección aguda por dengue, en los OSF la frecuencia de petequias en mucosas y las adenopatías cervicales fueron significativamente mayor. Igualmente, se realizó la comparación en el grupo de edad adolescente, se encontró que la frecuencia de brote, prueba del torniquete positiva y artralgias fue significativamente mayor en los casos de infección aguda por dengue, también fueron más frecuentes la hemorragia gingival, la metrorragia, el enrojecimiento de cara, el vómito y las mialgias comparado con los OSF, pero estas

diferencias no fueron significativas (tabla 6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros fisiológicos evaluados (tabla 7).

Finalmente, se realizó la comparación de los casos de infección aguda entre el grupo de edad escolar y adolescentes, encontrándose que las mialgias, artralgias ($p < 0,05$), el dolor retroocular, el brote, el dolor de cuello, la prueba del torniquete positiva ($p < 0,05$), la metrorragia, era más frecuente en el grupo de adolescentes, mientras que en el grupo de escolares fueron más frecuentes los síntomas respiratorios, dolor abdominal, la conjuntivitis y la hemorragia nasal (tabla 8). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros fisiológicos evaluados (tabla 9). Durante la fase convaleciente se observó un aumento en la frecuencia de algunos de los signos y síntomas con relación a la fase aguda, en el grupo de escolares el dolor retro-ocular (de 21,7 a 30,4%), la anorexia (de 56,5 a 65,2%), el vómito (de 21,7 a 39,1%), las náuseas (de 47,8 a 52,2%), la diarrea (de 17,4 a 26,1%), el brote (de 8,7 a 13,0%) y la hemorragia gingival (de 4,3 a 13,0%); en los adolescentes se encontró un aumento en la diarrea (de 11,8 a 25,0%), el dolor de garganta (de 41,2 a 56,3%), la dificultad respiratoria (de 23,5 a 31,5%), la hemorragia nasal (de 0,0 a 6,3%) y el dolor al orinar (de 11,8 a 25,0%).

Tabla 6. Comparación de los signos y síntomas clínicos entre los grupos de edad escolar y adolescente en los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

[Ver siguiente página]

Signos y síntomas	Escolares (6-12 años)						Adolescentes (13-18 años)					
	Infección aguda por dengue n=23		Otro síndrome febril n=147		Total n=170		Infección aguda por dengue n=17		Otro síndrome febril n=105		Total n=122	
	No.	%	No	%	No	%	No	%	No	%		
Estado general												
Astenia	21	91,3	121	82,3	142	83,5	17	100	97	92,4	114	93,4
Mialgia	11	47,8	45	30,6	56	32,9	12	70,6	48	45,7	60	49,2
Artralgia	9	39,1	38	25,9	47	27,6	13	76,5*	39	37,1	52	42,6
Lumbalgia	12	52,2*	23	15,6	35	20,6	10	58,8	36	34,3	46	37,7
Sistema nervioso												
Depresión	11	47,8	68	46,3	79	46,5	8	47,1	43	41,0	51	41,8
Parestesia	3	12,5	21	14,3	24	14,1	2	11,8	8	7,6	10	8,2
Cabeza												
Cefalea	18	78,3	120	81,6	138	81,2	14	82,4	89	84,8	103	84,4
Dolor retro-ocular	5	21,7	37	25,2	42	24,7	7	41,2	38	36,2	45	36,9
Eritema en garganta	17	73,9	99	67,3	116	68,2	12	70,6	64	61,0	76	62,3
Dolor de cuello	6	26,1	40	27,2	46	27,1	9	52,9	32	30,5	41	33,6
Petequias en mucosa	0	0,0	36	24,5*	36	21,2	3	17,6	17	16,2	20	16,4
Conjuntivitis	2	8,7	12	8,2	14	8,2	0	0,0	2	1,9	2	1,6
Enrojecimiento de cara	2	8,7	7	4,8	9	5,3	2	11,8	2	1,9	4	3,3
Otalgia	2	8,7	27	18,4	29	17,1	5	29,4	27	25,7	32	26,2
Adenopatías cervical	4	17,4	81	55,1*	85	50,0	5	29,4	34	32,4	39	32,0
Síntoma gastrointestinal												
Anorexia	13	56,5	86	58,5	99	58,2	13	76,5	60	57,1	73	59,8
Nauseas	11	47,8	74	50,3	85	50,0	9	52,9	43	41,0	52	42,6
Vómito	5	21,7	39	26,5	44	25,9	5	29,4	20	19,0	25	20,5

Dolor abdominal	4	17,4	16	10,9	20	11,8	0	0,0	15	14,3	15	12,3
Diarrea	4	17,4	26	17,7	30	17,6	2	11,8	13	12,4	15	12,3
Estreñimiento	3	13,0	15	10,2	18	10,6	2	11,8	10	9,5	12	9,8
Síntomas respiratorio												
Tos	16	69,6	98	66,7	114	67,1	9	52,9	70	66,7	79	64,8
Congestión nasal	16	69,6	92	62,6	108	63,5	9	52,9	71	67,6	80	65,6
Rinorrea	15	65,2	91	61,9	106	62,4	8	47,1	58	55,2	66	54,1
Dolor de garganta	14	60,9	84	57,1	98	57,6	7	41,2	64	61,0	71	58,2
Dificultad respiratoria	3	13,0	18	12,2	21	12,4	4	23,5	31	29,5	35	28,7
Manifestaciones hemorrágicas en piel												
Brote	2	8,7	5	3,4	7	4,1	3	17,6*	0	0,0	3	2,5
Brote generalizado	2	8,7	2	1,36	4	2,3	2	11,8	0	0,0	2	1,6
Equimosis	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,9	0	0,0	1	0,8
Prueba del torniquete Positiva (>10)	1	4,5	22	15,0	23	13,6	9	52,9*	10	9,5	19	15,6
Manifestaciones hemorrágicas en mucosas												
Hemorragia gingival	1	4,3	9	6,1	10	5,9	1	5,9	2	1,9	3	2,5
Hemorragia nasal	3	13,0	17	11,6	20	11,8	0	0,0	7	6,7	7	5,7
Metrorragia	0	0,0	2 [¥]	3,5	2	3,1 [¥]	2 [¥]	25,0	12 [¥]	18,5	14	19,2 [¥]
Sangre en heces	0	0,0	5	3,4	5	2,9	0	0,0	1	1,0	1	0,8
Sangre en orina	0	0,0	1	0,7	1	0,6	0	0,0	1	1,0	1	0,8
otros												
Dolor al orinar	0	0,0	13	8,8	13	7,6	2	11,8	6	5,7	8	6,6

*= Diferencia estadísticamente significativa valor de $p < 0,05$; ¥n=8 en los casos de dengue escolares y n= 57 en los otros casos de síndrome febril escolares; ¥n=8 en los casos de dengue en adolescentes y n= 65 en los otros casos de síndrome febril en adolescentes.

Tabla 7. Comparación parámetros fisiológicos entre los grupos de edad escolar y adolescente en los casos de infección aguda por dengue y los otros síndromes febriles en la fase aguda, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Parámetros fisiológicos	Escolares (6-12 años)						Adolescentes (13-18 años)					
	Infección aguda por dengue n=23		Otro síndrome febril n=147		Total n=170		Infección aguda por dengue n=17		Otro síndrome febril n=105		Total n=122	
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Frecuencia Respiratoria*	16	14--18	16	16-18	16	16--18	16	14,5--16	16	16--18	16	15-18
Pulso ⁺	92	82--100	90	80--100	90	80--100	80	80--92	84	79--90	83	80--90
Presión Arterial sistólica	100	90--110	100	90-100	100	90-100	100	100--115	110	100--110	105	100--110
Presión Arterial diastólica	60	60--70	60	60--70	60	60--70	70	60--70	70	60--80	70	60--80

*Respiraciones por minuto; +Latidos por minuto.

Tabla 8. Comparación Signos y síntomas entre los grupo de edad escolar y adolescente de los casos de infección aguda por dengue, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011.

Signos y síntomas fase aguda	Escolares n=23		Adolescentes n=17	
	No.	%	No.	%
Estado general				
Astenia	21	91,3	17	100
Mialgia	11	47,8	12	70,6
Artralgia	9	39,1	13	76,5*
Lumbalgia	12	52,2	10	58,8
Sistema nervioso				
Depresión	11	47,8	8	47,1
Parestesia	3	13,0	2	11,8
Cabeza				
Cefalea	18	78,3	14	82,4
Dolor Retro-ocular	5	21,7	7	41,2
Eritema en garganta	17	73,9	12	70,6
Dolor de cuello	6	26,1	9	52,9
Petequias en mucosa	0	0,0	3	17,6
Conjuntivitis	2	8,7	0	0,0
Enrojecimiento de cara	2	8,7	2	11,8
Otalgia	2	8,7	5	29,4
Adenopatías cervical	4	17,4	5	29,4
Síntoma Gastrointestinal				
Anorexia	13	56,5	13	76,5
Nauseas	11	47,8	9	52,9
Vomito	5	21,7	5	29,4
Dolor abdominal	4	17,4	0	0,0
Diarrea	4	17,4	2	11,8
Estreñimiento	3	13,0	2	11,8
Síntomas Respiratorio				
Tos	16	69,6	9	52,9
Congestión nasal	16	69,6	9	52,9
Rinorrea	15	65,2	8	47,1
Dolor de garganta	14	60,9	7	41,2
Dificultad respiratoria	3	13,0	4	23,5
Manifestaciones hemorrágicas en piel				

Brote	2	8,7	3	17,6
Brote generalizado	2	8,7	2	11,8
Equimosis	0	--	1	5,9
Prueba del torniquete positiva (>10)	1	4,5 [¥]	9	52,9*
Manifestaciones hemorrágicas en mucosas				
Hemorragia gingival	1	4,3	1	5,9
Hemorragia nasal	3	13,0	0	0,0
Metrorragia [°]	0	0,0--	2	25,0 [°]
Otros síntomas				
Dolor al orinar	0	0,0	2	11,8

*= Diferencia estadísticamente significativa valor de $p < 0,05$; [¥]n=22 en el grupo de escolares para la variable presencia de petequias; [°]n =8 en cada grupo para la variable metrorragia;

Tabla 9. Comparación parámetros fisiológicos entre los grupo de edad escolar y adolescente de los casos de infección aguda por dengue, en una cohorte de escolares de Medellín 2010 y 2011

Parámetros fisiológicos	Escolares n=23		Adolescentes n=17	
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3
Frecuencia Respiratoria*	16	14--18	16	14,5--16,0
Pulso ⁺	92	82--100	80	80--92
Presión Arterial sistólica	100	90--110	100	100--115
Presión Arterial diastólica	60	60--70	70	60--70

*=Respiraciones por minuto; +=Latidos por minuto.

Presentación clínica de los casos de dengue por infección primaria y secundaria

De los 41 casos de infección aguda por dengue, la mayoría (92,7%) eran infecciones secundarias y solo 3 casos (9,8%) eran infecciones primarias. Esta clasificación se realizó en un 60,9% (25/41), con los resultados del MNT50, y en las muestras que no se realizó ésta prueba, la clasificación se basó en el resultado de la ELISA IgG en la muestra aguda o en el ratio IgM/IgG, es decir el 39,1% (16/41) de las muestras. Se encontró que el promedio de edad de los casos fue $11,5 \pm 3,1$ y $9 \pm 3,5$ para las infecciones secundarias y primarias, respectivamente. Los casos de infección aguda por dengue con manifestaciones clínicas como lumbalgia, parestesia, depresión, conjuntivitis, enrojecimiento de cara, dolor abdominal, las manifestaciones hemorrágicas en piel y en mucosas se observaron principalmente en las infecciones secundarias. No se realizaron comparaciones entre grupos debido al bajo número de infecciones primarias encontradas en los casos evaluados.

Descripción de los serotipos circulantes

Se realizó RT-PCR en todas las muestras de fase aguda de los escolares con síndrome febril se encontraron 10 muestras positivas (3,7%), los serotipos encontrados fueron, seis muestras correspondientes al serotipo DENV1, tres al serotipo DENV-2 y una del serotipo DENV-3.

El Aislamiento viral se realizó en 41 de las muestras incluidas todas las positivas por RT-PCR, IgM y ELISPOT-MNT50. Se obtuvo el aislamiento del serotipo DENV1 en tres muestras que había sido previamente positivas por RT-PCR para este serotipo.

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS COMERCIALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA POR DENGUE

[Artículo enviado a la revista *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*]

1 PIEDRAHITA AND OTHERS

2 EVALUATION OF DENGUE DIAGNOSTIC ASSAYS

3 Evaluation of commercially available assays for diagnosis of acute dengue in schoolchildren
4 during an epidemic period in Medellin, Colombia

5 Leidy D. Piedrahita¹

6 Ivony Y. Agudelo¹

7 Andrea I. Trujillo²

8 Ruth E. Ramírez¹

9 Jorge E. Osorio²

10 Berta N. Restrepo*¹

11 *¹Instituto Colombiano de Medicina Tropical ICMT-Universidad CES, Sabaneta, Colombia;*

12 *²Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of*

13 *Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, United States of America*

14 **Key word: dengue virus, ELISPOT-MNT, Diagnosis, sensitivity, specificity**

15 **Abstract: 184 words, Text: 3197 words**

16 **List of Figures:**

17 Figure 1. ELISPOT-MNT₅₀ titers to each dengue serotype in acute and convalescents samples
18 from 26 cases of dengue infection

19 **List of Tables**

20 Table 1. Overall sensibility and specificity of the tests

21 **Abstract.** During an active surveillance study in primary school children in Medellin, we
22 assessed the performance of two diagnostic strategies for dengue virus. A total of 41 patients
23 with suspected dengue acute infection were evaluated. Diagnostic assays consisted of: one
24 combining Panbio® Dengue virus IgM and IgG Capture ELISAs with RT-PCR and another
25 using a commercial rapid SD Bioline IgG/IgM plus NS1 duo test. These two strategies were
26 compared with the enzyme-linked immunospot microneutralization test (ELISPOT-MNT). The
27 sensitivity and specificity were 53.85 % and 80.00 % for the combination of Panbio® ELISAs
28 and RT-PCR tests, and 30.77% and 73.33% for the SD Bioline duo test, respectively. ELISPOT-
29 MNT detected 16.4 % additional cases and revealed the presence of neutralizing antibodies in all
30 the acute samples, evidencing that they were all secondary infections. In contrast, Panbio® and
31 SD Dengue duo rapid tests only classified 23 % and 26.92 % of the cases as secondary dengue
32 infections, respectively. Cohen's kappa coefficient and McNemar's association test demonstrated
33 a significant disagreement between the two diagnostic strategies and ELISPOT-MNT. Overall,
34 these results evidences the relatively poor performances of commercial assays for the diagnosis
35 of acute and secondary dengue infections, compared to ELISPOT-MNT and raise concerns about
36 the accuracy of these assays for the diagnostic of dengue in endemic areas.

37 **Introduction**

38 Dengue is an increasing problem in tropical and subtropical regions worldwide. It was estimated
39 that about 390 million [95% CI: 284--528] cases of dengue infections occurred in 2010, of which
40 96 million [95%CI: 67--136] manifest apparently.¹ Dengue displays a wide range of clinical
41 manifestation from unapparent, mild fever to severe and fatal disease.² In Colombia, 147,257
42 dengue fever cases and 9,755 cases of severe dengue were reported in 2010.³

43 Dengue virus (DENV) is a positive-stranded RNA virus of the genus *Flavivirus*. There are four
44 antigenically distinct DENV serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) that display
45 high degree of antigenic cross-reactivity with other mosquito and tick-borne flaviviruses.⁴ In
46 Americas, DENVs are mainly transmitted to humans by *Aedes aegypti*, a highly domestic
47 mosquito whose females display a strong anthropophilia.⁵ All the four serotypes are present in
48 the country.⁶ After infection with any of DENV serotype, a long-lasting serotype-specific
49 immune response is induced. Secondary infection with another serotype has been associated with
50 more severe disease, due to antibody-dependent enhancement (ADE) by cross-reactive
51 antibodies and cross-reactive T cells. Nevertheless, most of the secondary infections are
52 asymptomatic or result in non-severe disease.⁷

53 There is no specific treatment for dengue virus infection. However, early diagnosis and good
54 supportive care can improve patient management and decrease dengue mortality.⁸ Thus,
55 diagnostic assays with good sensitivity and specificity are needed to differentiate dengue virus
56 infections from other febrile illness like leptospirosis, malaria, chikungunya, zika, influenza and
57 others.

58 Some laboratory tests can be used to confirm dengue infection, such as detection of DENV NS1
59 antigen, detection of anti-DENV IgM and IgG antibodies, RT-PCR and viral isolation. In general
60 practice, detection of anti-DENV antibodies is the most widely used test.⁹ In Colombia routine
61 diagnosis of dengue is performed by detection of anti-dengue IgM antibodies and, in few cases
62 viral isolation for epidemiological purposes.

63 Levels of anti-DENV IgM antibodies are detected in serum samples by ELISA. Anti-DENV IgM
64 antibodies are detectable from day 3--5 and in 99 % of the patients by day 10 post-infection. A
65 positive result in patients with clinical manifestations may be indicative of either active primary

66 or secondary dengue infections. However, during secondary infections, IgM antibodies may be
67 not detected.^{2,10} In contrast, the detection of anti-DENV IgG antibodies in serum is then useful
68 for determination of secondary infections since, high levels of anti-DENV IgG antibodies can be
69 detected in the acute phase and persist for long periods.² The standard method for the
70 differentiation of primary and secondary dengue infection is the haemagglutination inhibition
71 (HI) test, which is based on the ability of dengue antigens to agglutinate animal or human red
72 blood cells.¹¹

73 Typing anti-DENV antibodies is difficult due to cross-reactivity between the different DENV
74 serotypes and between DENV and others mosquito and tick-borne flavivirus. Russell and
75 Nisalak (1967) developed an in vitro assay using plaque reduction to measure DENV
76 neutralizing antibodies and to identify the infecting serotype. This assay is known as the plaque
77 reduction neutralization test (PRNT).¹² It is still considered the standard test to measure DENV
78 serotype-specific neutralizing antibodies and to make inference on the DENV serotype¹³
79 (despite no universal definition has been developed for the interpretation of the PRNT for this
80 purpose).¹⁴

81 However, standard methods such as HI and PRNT are labor-intensive, time-consuming and
82 require acute and convalescent sera with an interval of more than seven days, which makes them
83 inadequate for routine early diagnosis.¹⁵ Thus, HI test has been gradually replaced by capture
84 IgM and IgG ELISAs (11) and several microneutralization tests (MNT) have been developed
85 recently to overcome the limitations of PRNT. ELISPOT-MNT is a test performed in a 96-well
86 format, where viral plaques develop after 2 to 4 days of culture and viral antigen is detected in
87 infected cells by an indirect immunostaining method. Infected cells are turned into spots that are
88 detected automatically with an ELISPOT reader.¹⁶

89 In 2010, Colombia experienced the worst dengue outbreak in its history. During this epidemic
90 year and the following post-epidemic period, an active surveillance study of dengue cases in
91 schoolchildren was performed in the Colombian city of Medellin.¹⁷

92 We used samples from this study to evaluate the performances of commercially available assays
93 in comparison to ELISPOT-MNT used as a reference method. The specific aims of this study
94 were: i) to evaluate the accuracy of the combination of Panbio IgM and IgG capture ELISAs plus
95 RT-PCR and the accuracy of the SD Bioline duo rapid test (NS1 and IgM/IgG) for the diagnosis
96 of acute dengue infection in pediatric patients with febrile syndrome and ii) to determine the
97 accuracy and agreement of Panbio® IgM and IgG capture ELISAs and SD Bioline duo rapid test
98 to classify dengue infection in pediatric patients as primary or secondary.

99 **MATERIALS AND METHODS**

100 Full description of the study has already been published.¹⁷ Briefly, from May 2010 to December
101 2011, school-aged children from grade 5 to 11 were enrolled in a prospective longitudinal study
102 conducted in 3 schools in Medellin, Colombia. During the study period, dengue cases were
103 identified by school absenteeism due to a febrile episode in the previous 7 days. Two blood
104 samples were collected in the acute and in the convalescent phases (14--21 days after the date of
105 the onset of symptoms). 299 samples were obtained and were evaluated by RT-PCR (as
106 described elsewhere),¹⁸ and with Panbio® Dengue IgM and IgG Capture ELISAs. Among these
107 samples, 41 (consisting in both positive and negative samples) were also evaluated by SD Bioline
108 Dengue duo test and with ELISPOT-MNT.

109 Panbio® Dengue IgM Capture ELISA and Panbio® Dengue IgG Capture ELISA (Alere,
110 Brisbane, Australia) were respectively used to qualitatively determine IgM and IgG antibodies to
111 dengue virus, following manufacturer's instructions. Acute dengue virus infection was defined

112 by IgM or IgG seroconversion and/or detection of virus genome by RT-PCR. Positive cases were
113 classified as primary dengue infection if IgG test was negative in the acute serum sample or
114 secondary dengue virus infection if the test was positive. SD Bioline Dengue Duo test (Standard
115 Diagnostics, Kyonggi-do, South Korea) was used according to the manufacturer's instruction to
116 detect the nonstructural DENV NS1 antigen, IgM and IgG anti-DENV antibodies. Only acute
117 samples were tested with this method. Results of this test were interpreted as dengue positive if
118 NS1 antigen and/or IgM were positive. Positive cases were classified as primary or secondary
119 dengue infection respectively when IgG test was negative or positive.

120 To perform ELISPOT-MNT, VERO cells were seeded in 96-well polystyrene plates. Serum
121 samples were inactivated at 56°C for 30 min and four-fold serial dilutions were carried out
122 starting at 1:20 in BA-1 medium. Working stocks of virus that contained 100-200 pfu of DENV
123 were prepared. Prototype viruses used for this test were DENV-1 16007, DENV-2 16681,
124 DENV-3 16562 and DENV-4 1036. Fifty µL of each serum dilution was combined with 50 µL of
125 each virus and incubated for 16 hours at 4°C. After incubation, 50 µL of the virus-serum mixture
126 was transferred to 90 % confluent VERO cells. After an additional incubation for 2–3 days, the
127 cells were fixed with 3.7 % formaldehyde. Immunostaining was performed by incubation of the
128 plates (overnight at 4°C) with polyclonal rabbit antibodies against each serotype of DENV,
129 followed by incubation (2 hours at 37°C) with goat anti-rabbit IgG (H+L) antibodies coupled to
130 horseradish peroxidase (Thermo Scientific Inc., Massachusetts, USA). Revelation was performed
131 with the substrate-chromogen AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) and the number of foci in each
132 well was counted with an automatized C.T.L immunoSpot® analyzer (Cellular Technology Ltd.,
133 Ohio, USA).

134 The ELISPOT-MNT₅₀ titer was defined as the dilution of serum that reduced the number of
135 plaques by at least 50 % when compared to the virus-only control. When ELISPOT-MNT₅₀
136 values were < 1:20, serum was considered containing no detectable neutralizing antibodies.

137 Acute infection was defined serologically by a 4-fold rise in neutralizing antibody titers between
138 the acute and convalescent samples of a single patient, as determined by ELISPOT-MNT,
139 whatever the serotype of DENV. Cases that were negatives in the acute sample but positives to
140 any DENV serotype in the convalescent sample were considered as primary DENV infection.
141 Cases with neutralizing antibodies to two or more DENV serotypes in the acute sample were
142 defined as secondary DENV infection. Non-reactive cases were determined by absence of
143 neutralizing antibodies in both samples. Non-recent infections were determined by the presence
144 of neutralizing antibodies in both acute and convalescent samples and no changes/reductions in
145 the ELISPOT-MNT₅₀ titer. Homotypic or heterotypic immune response were defined as positive
146 responses against single or multiple serotypes, respectively.¹⁴

147 Statistical analysis was performed using EPIDAT version 3.1 (Pan American Health
148 Organization, Xunta of Galicia, Spain). Cross tabulation was conducted to assess sensitivity,
149 specificity, positive and negative predictive values (PPV/NPV) and positive and negative
150 likelihood ratios (LR-/LR+) of the different tests. The agreement between the different methods
151 and ELISPOT-MNT was assessed by Cohen's kappa coefficient (κ) and McNemar's test.
152 Sensitivity was compared between the two methods by Chi-squared test (two-tails).
153 Significance was assigned at $p \leq 0.05$. Uncertainty was expressed by 95 % confidence intervals
154 (95%CI).

155

156 **Ethical Human Subjects Protocol Approval**

157 Only schoolchildren whose parents or legal guardians provided written informed consent were
158 enrolled in the study. This research was approved by the Ethical Review Committee of Instituto
159 Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES.

160

161 **RESULTS**

162 The ages of the 41 selected patients ranged from 6 to 18 years (mean = 12.1 SD \pm 3). Acute
163 samples were drawn 3.4 ± 1.4 days and convalescent samples were drawn 14.0 ± 3.8 days after
164 the onset of symptoms.

165 Using the combination of RT-PCR and Panbio® IgM and IgG capture ELISAs, 41.5% (17/41)
166 were classified as positive for dengue virus infection. Two of them were found positives
167 simultaneously by RT-PCR, IgM and IgG detections; five were found positives simultaneously
168 by IgM and IgG detection; two were found positives by detection of IgM antibodies only; one
169 was found positive only by seroconversion of IgG antibodies and 7 were found positives by RT-
170 PCR only. The serotypes found were DENV-1 (5 cases), DENV-2 (3 cases) and DENV-3 (1
171 case). Among these cases, Panbio® IgG capture ELISA determined that 47.05 % (8/17) of the
172 cases were classified as secondary infections (high levels of anti-DENV IgG). These secondary
173 infections were detected in 5 acute specimens (29.41 %) and in three convalescent specimens
174 (17.64 %, although this test is usually used in the acute specimen). The other positive (9/17)
175 samples were classified as primary dengue infections. All dengue cases were classified as non-
176 severe or non-differentiated fever.

177 Using SD Bioline Dengue duo rapid test, 29.26 % (12/41) of the acute samples were classified as
178 positive for dengue virus infection. One was found positive by simultaneous detection of NS1
179 antigen, IgM and IgG antibodies; two of them were found positives by the simultaneous

180 detection of NS1 antigen and IgM antibodies; eight were found positives by the simultaneous
181 detection of IgM and IgG antibodies and one was found positive by the only detection of IgM
182 antibodies. The IgG of SD Bioline Dengue duo rapid test determined that 75% (9/12) of the
183 cases were classified as secondary infections. The other positive samples (3/12) were classified
184 as primary dengue infections.

185 In contrast to the results obtained with the combination of RT-PCR and Panbio® IgM and IgG
186 capture ELISAs (41.5 % of positive cases) and SD Bioline Dengue duo rapid test (29.26 % of the
187 positive cases), ELISPOT-MNT evidenced acute dengue infection in 63.41 % (26/41) of the
188 cases. All the cases displayed neutralizing antibody titers in the acute samples and were
189 classified therefore as secondary infections. Figure 1 shows the acute and convalescent
190 neutralization titers for each DENV serotype.

191 Among these 26 cases determined to be acute secondary infections by ELISPOT-MNT, Panbio®
192 IgG Capture ELISA detected high IgG levels in 11.5 % (3/26) of the cases in the acute samples
193 and three more IgG seroconversion in the convalescent specimen. It was found that three cases
194 were positives in the acute sample but negatives in the convalescent sample, indicating that those
195 cases were no recent infection. The IgG SD Bioline detected 26.96 % (7/26) of the cases as
196 secondary infections.

197 It was determined with ELISPOT-MNT that 14/26 cases had four-fold increase in neutralizing
198 antibody titers to a single DENV serotype [DENV-1: 19.23 % (5/26), DENV-2: 15.38 % (4/26),
199 DENV-3: 7.69 % (2/26) and DENV-4: 11.53 % (3/26)]. The twelve other cases were found to
200 had four-fold increase in neutralizing antibody titers to multiple DENV serotypes [DENV-
201 1/DENV-4: 19.23 % (5/26), DENV-2/DENV-4: 3.84 % (1/26), DENV-3/DENV-4: 3.84 %

202 (1/26), DENV-1/DENV-2/DENV-3: 3.84 % (1/26), DENV-1/DENV-3/DENV-4: 11.53 %
203 (3/26), and to all four serotypes: 3.84 % (1/26)].

204 Interestingly, all cases (36.58 %, 15/41) that were not determined to be acute dengue infection by
205 ELISPOT-MNT (defined as 4-fold increase in neutralizing antibody titers between acute and
206 convalescent samples) had high neutralizing antibody titers and were therefore classified as non-
207 recent infections. In all positive cases with ELISPOT-MNT, we found high antibody titers to
208 more than one serotype in the convalescent samples.

209 Using ELISPOT-MNT as gold standard, statistical analysis was conducted to determine the
210 sensitivity and, the specificity of the two diagnostic strategies (The combination of RT-PCR plus
211 IgM and IgG ELISAs, and SD Bioline duo test) as well as their agreement to the results of
212 ELISPOT-MNT (Table 1). The combination of RT-PCR plus IgM and IgG ELISAs correctly
213 identified 14 of the 26 acute cases determined by ELISPOT-MNT. Of the 15 infections
214 determined as non-recent by ELISPOT-MNT, the combination of the tests identified 12 cases as
215 negatives and 3 cases as positives DENV infections. The overall sensitivity and specificity of the
216 combination of RT-PCR plus Panbio® IgM and IgG ELISAs were determined to be 53.85 %
217 [95% CI= 32.76--74.93 %] and 80 % [95%CI= 56.42--100 %], respectively. The positive
218 predictive value was 82.35 % [95%CI= 61.29--100 %], the negative predictive value was 50 %
219 [95%CI= 27.91--72.09 %], the LR+ was 2.69 [95%CI= 0.92--7.87] and the LR- was 0.58
220 [95%CI= 0.35--0.94]. SD Bioline Dengue duo rapid test correctly identified 8 out of the 26 acute
221 cases determined by ELISPOT-MNT. The rapid test identified 11 cases as negative and 3 cases
222 as positives DENV infections among the 15 non-recent infections determined by ELISPOT-
223 MNT. The overall sensitivity and specificity of SD Bioline Dengue duo rapid test were 30.77 %
224 [95% CI= 11.11--50.43 %] and 73.33 % [95%CI= 56.42--100 %], respectively. The positive

225 predictive value was 66.67 % [95%CI= 35.83--97.51 %], the negative predictive value was 37.93
226 % [95%CI=18.55--57.31 %], the LR+ was 1.15 [95%CI= 0.42--3.19] and the LR- was 0.94
227 [95%CI= 0.63--1.41]. In addition, the sensitivity of the combination of RT-PCR plus Panbio®
228 IgM/IgG ELISAs was significant higher than the SD Bioline Dengue duo rapid test ($p < 0.05$).
229 The agreement between ELISPOT-MNT and the combination of RT-PCR plus Panbio®
230 IgM/IgG ELISAs was considered to be fair by a Cohen's κ coefficient test ($\kappa = 0.30$), whereas it
231 was considered to be poor for SD Bioline Dengue duo rapid test ($\kappa = 0.034$). The McNemar's
232 association test demonstrated a significant disagreement between each of the diagnostic
233 strategies used and ELISPOT-MNT ($p = < 0.05$), suggesting that both strategies don't give the
234 same results that ELISPOT-MNT.

235 The performances of the individual test were also assessed (see Table 1). As expected, individual
236 performances were lower than the performances of the strategies combining several tests.
237 Additionally, we evaluated the performance of the combination of the direct detection tests (RT-
238 PCR plus NS1 antigen) versus ELISPOT-MNT. We found that the sensitivity and specificity
239 were 34.62 % [95%CI= 14.41—54.83 %] and 93.33 % [95%CI=77.38—100 %], respectively.
240 Positive predictive value was 90 % [95%CI=66.41—100 %] and the negative predictive value
241 was 45.16 % [95%CI= 47.45—79.38 %]. The agreement between ELISPOT-MNT and the
242 combination of RT-PCR plus NS1 antigen was considered to be fair by a Cohen's κ coefficient
243 test ($\kappa = 0.228$). Finally, virus isolation was possible in 95.12 % (39/41) of the samples and
244 dengue virus serotype one was recovered in three of them.

245 **DISCUSSION**

246 Analyzing 41 pediatric cases from an epidemiological study held in Colombia (a country where
247 DENV is endemic), we were able to evaluate the performance of two strategies for acute DENV

248 diagnostic based on commercially available assays (Panbio® IgM and IgG ELISAs plus RT-
249 PCR and SD Bioline Dengue duo rapid test), using ELISPOT-MNT as comparative standard
250 method.

251 ELISPOT-MNT evidenced acute dengue infection in 26/41 cases. All the positive cases were
252 non severe and clinically undifferentiated from other febrile illnesses. Panbio® IgM and IgG
253 ELISAs plus RT-PCR only evidenced 14 cases of dengue infections and SD Bioline Dengue duo
254 rapid test only detected 8 positive cases. This led to low sensitivity of both strategies when
255 compared to ELISPOT-MNT (53.85 % for the combination of Panbio® ELISAs and RT-PCR,
256 and 30.77 % for the SD Bioline duo test) and to a significant disagreement between both
257 strategies and ELISPOT-MNT. Moreover, all positive cases were classified as secondary dengue
258 infections with the ELISPOT-MNT assay whereas Panbio® and SD Dengue duo rapid tests only
259 classified 23.07 % and 26.92 % of the positive cases as secondary dengue infections,
260 respectively.

261 Interestingly, all our observations indicate previous exposures to DENV in all the patients,
262 despite the young age of the tested population. Indeed, all the patients had detectable neutralizing
263 antibodies titers in the acute sample as well as heterotypic antibody responses. In addition, all
264 acute dengue infections were non severe and undifferentiated of other febrile illnesses.

265 It is well known that infection with any DENV serotype results in a transient increase of
266 neutralization titers to all the other serotypes.¹⁴ Different studies suggest that preexisting
267 neutralizing antibodies play an important role in protecting patients from clinical manifestations
268 after repeated DENV infections, specifically when intervals of 2--3 years occur between the
269 infections.^{19,20} In a recent study, samples collected from a Sri Lankan pediatric dengue cohort
270 (799 children) were used to investigate antibody responses in children with clinically unapparent

271 and clinically apparent DENV infections.¹⁹ It was reported that children with repeated
272 unapparent infections had a greater number of broadly preexisting neutralizing antibodies against
273 DENV serotypes than children with apparent infections.¹⁹

274 The fact that all patients included in our study were classified as acute dengue secondary
275 infections (using the ELISPOT-MNT method) may be a contributing factor to the poor
276 performances of the two dengue diagnostic strategies. Indeed, the presence of immune
277 complexes of anti-NS1 IgG antibodies that occurs most frequently in secondary DENV
278 infections²¹ may interfere with the detection of NS1 antigen, which may raise a concern for the
279 accuracy of the SD Bioline Dengue Duo assay. In this study, we found that the sensitivity of the
280 SD Bioline Dengue Duo assay using NS1 antigen detection only was as low as 11.54 %. This is
281 in agreement with the low sensitivity of NS1 detection observed during a dengue outbreak in
282 2010 in Santos, Brazil, where most of the infections were secondary infections and DENV-2 was
283 the infecting serotype. (22) Sequencing analysis of the NS1 gene of these viruses did not reveal
284 any mutation that could altered its reactivity with this diagnosis test. Low sensitivity (11%) was
285 also reported when samples were drawn 4-5 days after the onset of symptoms.²² In other studies
286 where NS1 antigen detection with the SD Bioline Dengue duo was compared to RT-PCR, the SD
287 Bioline assay displayed better performances with specimens from patients with primary
288 infections and when DENV-1 or DENV-3 were the infecting serotypes.^{21,23} Guzman et al.⁸ also
289 reported lower sensitivity of NS1 antigen detection in American countries (Nicaragua and
290 Venezuela) compared with Asian countries^{8,24}

291 The occurrence of secondary infections also seems to have an impact on the accuracy of IgM and
292 IgG detections. Indeed, higher sensitivity of the anti-IgM SD Bioline Dengue duo was evidenced
293 in primary DENV infections compared to secondary infections.²¹ This is in accordance with our

294 results that evidenced poor performances of both Panbio® IgM Capture ELISA and IgM SD
295 Bioline Dengue Duo rapid test (sensitivity of 26.92 % and 30.77 %, respectively). It has been
296 documented that IgM antibody production is lower and transitory in secondary infections and
297 that some of the patients with secondary infections may even have no detectable IgM
298 antibodies.^{10, 25}

299 Despite the high neutralizing antibody titers detected by ELISPOT-MNT in all cases, both
300 Panbio® IgG Capture ELISA and SD Bioline Dengue duo IgG test displayed low performances
301 at detecting IgG antibodies in patients with acute DENV secondary infections (sensitivity of
302 34.62% and 26.92%, respectively). This is consistent with a published study comparing the
303 performances of the Panbio® IgG Capture ELISA with the IgG antibody capture (GAC) ELISA
304 developed by AFRIMS on samples from Thailand and Sri Lanka that reported a sensitivity of
305 39.8 % for the Panbio® IgG Capture ELISA.²⁶

306 In our study, specificity and sensitivity of these tests were not determined regarding each DENV
307 serotype since it was possible to amplify the genes of only 30.8 % of the positive cases by
308 ELISPOT-MNT even though the tests was done within 7 days after the onset of symptoms.
309 Additionally, it was only possible to isolate DENV-1 from 3 samples.

310 Despite a rigorous approach concerning sample processing (standardized conditions of cell and
311 viral cultures, simultaneous processing of acute and convalescent samples in triplicates), our
312 results were obtained on a small sample size of the population, which should prompt us to
313 interpret the data with caution. Additional studies with increased amounts of well-characterized
314 paired samples have to be considered to strengthen the conclusions, as well as data on adult
315 populations. However, it has to be stressed that many reports that granted acceptable
316 performances to commercially available dengue assays used ELISAs as comparators instead of

317 gold standard methods such as PRNT^{8,21,23,26}. A recent study showed that ELISPOT-MNT had a
318 sensitivity of 95.6 % and a specificity of 88.24 %, with a good correlation ($R^2 = 0.672$) with
319 PRNT.¹⁶ Due to its very high sensitivity, the use of ELISPOT-MNT as the comparative standard
320 method in our study leads inevitably to lower statistics performances of the assays that are
321 compared to it, which can explain the relatively low performances of both diagnostic strategies.

322

323 As a conclusion, in our pediatric population of secondary infected patients, combination of
324 commercially available ‘easy-to-use’ tests didn’t give satisfactory results in detecting acute
325 dengue infection when compared to the ELISPOT-MNT assay that is unsuitable for routine
326 diagnostic. In population where dengue infection is endemic, the predominance of secondary
327 infections combined with the wide range of other febrile illnesses with similar clinical
328 characteristics to DENV infections increase the difficulty of making accurate dengue fever
329 diagnostic. However, an early and precise dengue diagnostic is important for patient
330 management, to avoid dengue severity and mortality, and ultimately to control epidemics.^{8,21,26}
331 Our results agree with others who reported that the combination of two or more diagnostic
332 strategies is needed to improve the diagnostic accuracy of dengue virus infection.^{8, 21–23, 26}.
333 Combining direct DENV detection and antibody-based tests seems to be a particularly promising
334 strategy. However, as seen in this study and evidenced by the low LR+ and LR- values,
335 combinations of current assays do not guarantee the accuracy of the diagnosis when compared to
336 standards such as PRNT or ELISPOT-MNT. Several studies evidenced that the diagnostic
337 performances of different dengue diagnosis kits vary depending on geographical and temporal
338 factors (8,22,24,27). Thus, validation of those kits in one country should take into account: i) the
339 epidemiological settings (endemic, epidemic and hyperepidemic periods), ii) the genetic

340 background and immunological status of studied population, the different phases of the dengue
341 disease and iii) the dengue virus serotypes and genotypes that are circulating in the area.

342 While other studies are needed to further document our findings, it is important that national
343 public health services and clinicians are aware of the current limitations of using commercial
344 assays for dengue diagnostic in endemic regions. Accordingly, clinicians should not rule out a
345 dengue infection based solely on a negative result from any of these tests, especially in countries
346 with high dengue prevalence. Facing a patient with febrile syndrome and highly suspected
347 dengue infection, clinician should go ahead with adapted supportive care and rely on clinical
348 observations for diagnostics even in case of a negative laboratory result.

349

350 **Acknowledgments**

351 A special thanks to all participating schools, physicians and nurses for their help in the field and
352 to Willy Berlier, PhD., for advices on manuscript preparation.

353

354 **Financial Support**

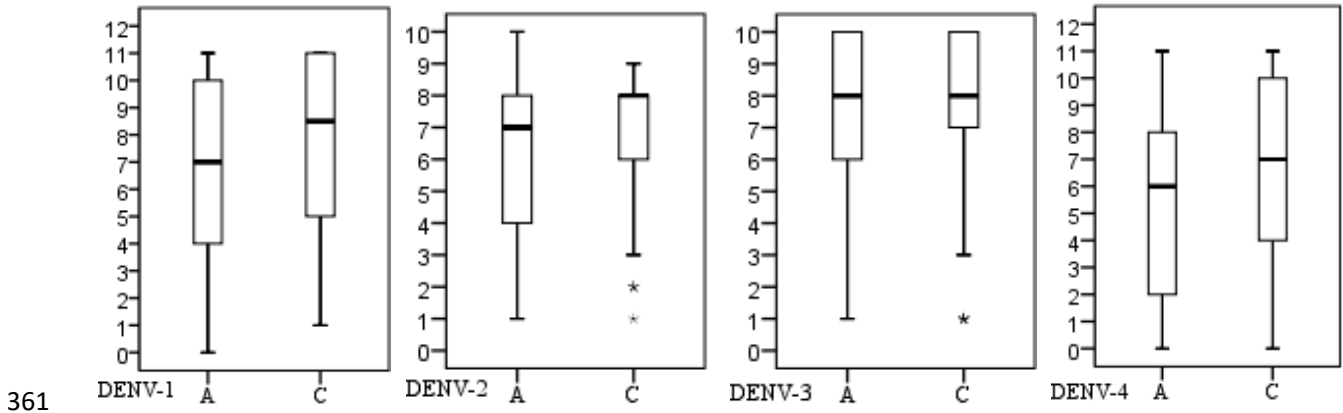
355 This work was supported by Colciencias (Project no. 325649326211).

356

357 **Disclosures conflicts of interest**

358 All authors: No reported conflicts.

359 Figure 1. ELISPOT-MNT₅₀ titers to each dengue serotype in acute and convalescents samples from
 360 26 cases of dengue infection.



362 Box and whisker plot represent the range, median and 25–75% inter-quartile ranges are shown
 363 for acute (A) and convalescent (C) samples for each dengue serotype. Antibodies titers are
 364 represented as an integer value along the y axis. 0= lower than 1:20; 1=1:21---1:40; 2=1:41--1:80;
 365 3=1:81--1:160; 4=1:161--1:320; 5=1:321--1:640; 6=1:641--1:1280; 7=1:1281--1:2560;
 366 8=1:2561--1:6400; 9=1:6401--1:10240; 10=1:10241--1:40960; 11=1:40961--1:163840 and
 367 12=higher than 1:163841.

368

369 Table 1. Overall sensibility and specificity of the tests

Test (n=41)	Panbio® IgM Capture ELISA	Panbio® IgG Capture ELISA	RT-PCR	Combination of the 3 tests	SD BIOLINE IgM	SD BIOLINE IgG	NS1 Antigen	BIOLINE Dengue Duo NS1 + IgM/IgG
Sensibility	26.92	34.62	30.77	53.85	30.77	26.92	11.54	30.77
% (95CI ^a)	(7.95--45.90)	(14.41--54.83)	(11.11--50.43)	(32.76--74.93)	(11.11--50.43)	(7.92--45.90)	(0.00--25.74)	(11.11--50.43)
Specificity	86.67	60.00	93.33	80.00	73.33	66.67	100	73.33
% (95CI)	(66.13--100)	(31.87--88.13)	(77.38--100)	(56.42--100)	(47.62--99.05)	(39.48--93.86)	(96.67--100)	(47.62--99.05)
PPV ^b	77.78	60.00	88.89	82.35	66.67	58.33	100	66.67
% (95CI)	(45.06--100)	(31.87--88.13)	(62.80--100)	(61.29--100)	(35.83--97.51)	(26.27--90.39)	(83.33--100)	(35.83--97.51)
NPV ^c	40.63	34.62	43.75	50	37.93	34.48	39.47	37.93
% (95CI)	(22.05--59.20)	(14.41--54.83)	(25.00--62.50)	(27.91--72.09)	(18.55--57.31)	(15.46--53.51)	(22.62--56.33)	(18.55--57.31)

370 ^a 95CI= 95% Confidence interval; ^b PPV= Positive predictive value; ^c NPV= Negative predictive value

REFERENCES

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 25 de abril de 2013;496(7446):504-7.
2. WHO | Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition [Internet]. WHO. [citado 6 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>
3. Estadísticas SIVIGILA - public [Internet]. [citado 12 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Estadsticas%20SIVIGILA/Forms/public.aspx>
4. Fields' Virology [Internet]. [citado 17 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: http://books.google.es/books?id=500somr0w18C&pg=PR5&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false
5. Halstead SB. Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol*. 2008;53(1):273-91.
6. Instituto Nacional De Salud [Internet]. Vigilancia Rutinaria. 2014. Recuperado a partir de: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
7. Zompi S, Santich BH, Beatty PR, Harris E. Protection from Secondary Dengue Virus Infection in a Mouse Model Reveals the Role of Serotype Cross-Reactive B and T Cells. *J Immunol*. 1 de enero de 2012;188(1):404-16.
8. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).
9. Wiwanitkit V. The importance of accurate diagnosis of dengue fever. *Future Virol*. enero de 2012;7(1):53-62.
10. Falconar AKI, de Plata E, Romero-Vivas CME. Altered Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Immunoglobulin M (IgM)/IgG Optical Density Ratios Can Correctly Classify All Primary or Secondary Dengue Virus Infections 1 Day after the Onset of Symptoms, when All of the Viruses Can Be Isolated. *Clin Vaccine Immunol*. septiembre de 2006;13(9):1044-51.
11. Shu P-Y, Chen L-K, Chang S-F, Yueh Y-Y, Chow L, Chien L-J, et al. Comparison of Capture Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific IgG ELISA for Differentiation of Primary and Secondary Dengue Virus Infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. julio de 2003;10(4):622-30.
12. Russell PK, Nisalak A. Dengue Virus Identification by the Plaque Reduction Neutralization Test. *J Immunol*. 8 de enero de 1967;99(2):291-6.

13. GUIDELINES FOR PLAQUE-REDUCTION NEUTRALIZATION TESTING OF HUMAN ANTIBODIES TO DENGUE VIRUSES. [Internet]. [citado 9 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_ivb_07.07_eng.pdf
14. Van Panhuis WG, Gibbons RV, Endy TP, Rothman AL, Srikiatkachorn A, Nisalak A, et al. Inferring the serotype of dengue virus infections based on pre- and post-infection neutralizing antibody titers. *J Infect Dis.* 1 de octubre de 2010;202(7):1002-10.
15. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *Am J Trop Med Hyg.* 11 de enero de 2009;81(5):825-33.
16. Liu L, Wen K, Li J, Hu D, Huang Y, Qiu L, et al. Comparison of Plaque- and Enzyme-Linked Immunospot-Based Assays To Measure the Neutralizing Activities of Monoclonal Antibodies Specific to Domain III of Dengue Virus Envelope Protein. *Clin Vaccine Immunol CVI.* enero de 2012;19(1):73-8.
17. Restrepo BN, Piedrahita LD, Agudelo IY, Parra-Henao G, Osorio JE. Frequency and Clinical Features of Dengue Infection in a Schoolchildren Cohort from Medellin, Colombia. *J Trop Med [Internet].* 2012 [citado 9 de diciembre de 2014];2012. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530854/>
18. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* septiembre de 1998;36(9):2634-9.
19. Corbett KS, Katzelnick L, Tissera H, Amerasinghe A, de Silva AD, de Silva AM. Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a Sri Lankan pediatric cohort. *J Infect Dis.* 15 de febrero de 2015;211(4):590-9.
20. Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, et al. Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 de agosto de 2013;7(8):e2357.
21. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 16 de octubre de 2014 [citado 25 de marzo de 2015];8(10). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199549/>
22. Felix AC, Romano CM, Centrone C de C, Rodrigues CL, Villas-Boas L, Araújo ES, et al. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clin Vaccine Immunol CVI.* diciembre de 2012;19(12):1972-6.
23. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol J.* 2010;7:361.

24. Andries A-C, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, et al. Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 27 de diciembre de 2012 [citado 11 de diciembre de 2015];6(12). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531494/>
25. Paula D, Oliveira S, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis*. diciembre de 2004;8(6):390-8.
26. Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons RV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP, Nisalak A, et al. Comparison of Seven Commercial Antigen and Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Acute Dengue Infection. *Clin Vaccine Immunol CVI*. mayo de 2012;19(5):804-10.
27. Vickers IE, Harvey KM, Brown MG, Nelson K, DuCasse MB, Lindo JF. The performance of the SD BIOLINE Dengue DUO® rapid immunochromatographic test kit for the detection of NS1 antigen, IgM and IgG antibodies during a dengue type 1 epidemic in Jamaica. *J Biomed Sci*. 16 de julio de 2015;22(1):55.

CAPITULO 3

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG CONTRA EL VIRUS DENGUE

Metodología

Con el fin de determinar la presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue se realizó la estandarización de una técnica casera de ELISA indirecta (130,131).

Antígeno

Se utilizaron 3 lotes diferentes de antígeno debido a la cantidad de muestras a evaluar.

Cada lote fue validado de manera independiente.

El primer lote consistía en la mezcla de sobrenadante de las cepas DENV-1 (West Pac); DENV-2 (S16803); DENV-3 (CH53489); DENV-4(TVP360). Este lote lo denominaremos L1 y fue adquirido gracias a la colaboración del grupo de virología del profesor Jorge Osorio del PECET. Con este lote fue posible evaluar alrededor de 900 muestras.

El lote dos (L2) consistía en 3 cepas de referencia DENV-1 (Hawaii); DENV2- (New Guinea C), DENV-4 (TVP360) y un aislado primario de DENV-3 obtenido de un paciente de Medellín en 2010 y denominado DENV-3 JAC. Fue adquirido gracias a la colaboración del Profesor Francisco Diaz de grupo de Inmunovirología; con este lote se tuvo la dificultad se degradaba, por lo que fue liofilizado y se procesaron alrededor de 1.000 muestras.

El lote tres (L3) consistía en un antígeno liofilizado de los 4 serotipo del virus dengue donado por el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí "IPK". Con este, se procesaron alrededor de 3.600 muestras.

Para cada lote se realizó estandarización de la dilución de antígeno (L1 1:100; L2 1:10.000; L3 1:100) la dilución de suero utilizada fue 1:200 en los 3 lotes, cada muestra se corrió por triplicado y la concentración del anticuerpo anti-IgG humana conjugado a la peroxidasa se estandarizó en 1:10,000.

Controles

Los controles positivos y negativos usados en un principio fueron los controles de los estuches comerciales de Panbio, pero debido al número de platos a evaluar no fue suficiente para todos los platos procesados (en total 220). Se evaluaron entonces sueros del banco de sueros del ICMT con el Lote 1 y se realizó un pool negativo y un pool positivo para posterior utilización como controles en el resto de los lotes.

Punto de corte

En un primer análisis se determinó el punto de corte mediante el promedio de la absorbancia del control negativo más la suma de un error estándar calculado dividiendo la desviación estándar de las absorbancias de los controles negativos por la raíz cuadrada de n. Todas las muestras fueron procesadas por triplicado por lo cual fue considerado un valor n de 3. Este valor se multiplicó por un nivel de confianza del 95% que está definido por una unidad "z" igual a 1,96. Las muestras fueron consideradas positivas si el promedio de la absorbancia era mayor al punto de corte.

Al realizar el análisis de los datos de Densidad óptica (D.O) se encontró que el pool de sueros control negativo, poseía un muestra que era positiva, que no había sido detectada por la ELISA realizada con el L1, por lo que el valor de D.O aumentaba y no se podía usar este valor para la determinación del punto de corte, se decide entonces determinar y analizar los datos usando una estrategia diferente. En primer lugar expresar los datos en porcentaje de positividad (PP), teniendo en cuenta que en la Elisa indirecta existe una relación positiva entre la intensidad del color y la cantidad de anticuerpo unido al antígeno usado en la prueba (130).

En el Porcentaje de positividad (PP), la Densidad Óptica (D.O) de cada muestra evaluada es expresada con un porcentaje de estándar o muestra con alta positividad. Ésta medida relativa, es basada en la inclusión de una solo estándar positivo de referencia, los resultados son un valor uniforme y continuo en escala de porcentaje de positividad (PP) 0 a 100 para la ELISA indirecta. Posee la ventaja de que requiere una sola dilución y es expresada en una escala continua de PP 0-100 (130).

Debido a los inconvenientes previamente expuestos: la ausencia de un verdadero control negativo en el procesamiento de los platos y los diferentes lotes utilizados, se decide utilizar un método alternativo y realizar la determinación de un punto de corte intrínseco usando los datos de PP de las muestras procesadas, este método descrito por Greiner M y col (1994) utiliza la distribución de los datos de individuos expuestos en zonas endémicas y mediante el análisis de conglomerados los individuos son clasificados en un nivel de respuesta alto , medio y bajo. Ofrece un estimación imparcial de la seroprevalencia en ausencia de un control negativo (132) .

El Análisis de Conglomerados permite agrupar objetos formando conglomerados (clusters) de objetos con alto grado de homogeneidad interna y heterogeneidad externa. Es un análisis descriptivo, las soluciones dependen de las variables consideradas y del método de conglomerados empleado (133,134).

Se realizó un análisis jerárquico en SPSS para determinar el número de grupos y los centroides, posteriormente, se realizó un análisis no jerárquico por el método k-medias, donde se analiza la distancia de cada dato a los k centroides previamente determinados y se asigna al más cercano. Se recalcula los centroides y se vuelve a asignar más datos. El proceso finaliza cuando los datos no cambian de grupo o cuando se alcanza el máximo número de iteraciones. El objetivo es lograr que la variabilidad (homogeneidad) dentro del conglomerado sea la menor posible y la variabilidad (heterogeneidad) entre los grupos sea la mayor posible (134).

Resultados

Punto de corte

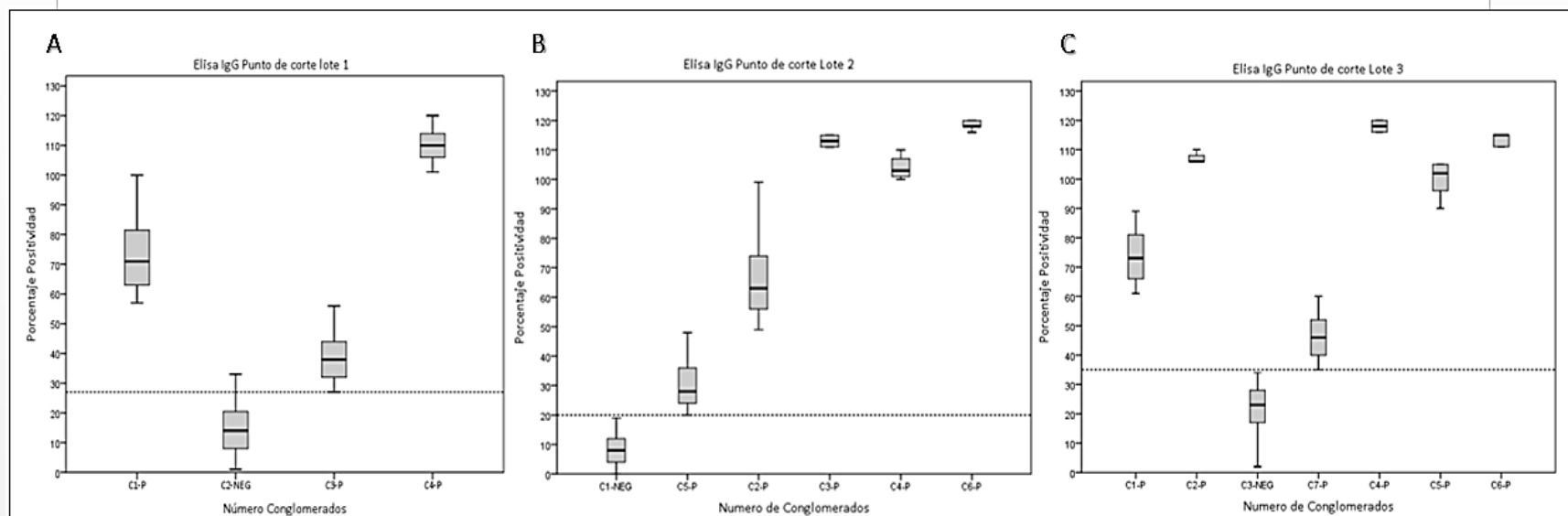
Mediante el análisis de conglomerados de k-medias en SPSS se logró determinar un el número de conglomerados óptimos para cada uno de los lotes, es decir, que tuvieran la mayor heterogeneidad (media cuadrática) entre conglomerados y la mejor homogeneidad dentro del conglomerado. Es así como para el lote 1, cuatro grupos de respondedores fueron encontrados, para el lote 2, seis grupos y para el lote 3 siete grupos. En cada uno de ellos se diferencié claramente un grupo de bajo respondedores cuyos media del porcentaje de positividad fue de $14,16 \pm 7,16$; $8,31 \pm 4,88$; $22,34 \pm 7,5$ para el lote 1, 2, 3 respectivamente. Este valor se determinó como puntos de corte y todos los datos que el programa asignó a este conglomerado fueron considerados negativos (Tabla 10 y Figura 2)

Tabla 10. Descripción conglomerados por análisis k-medias para cada uno de los lotes en la estandarización de la ELISA indirecta

LOTE	N	N° de Conglomerados	Media Cuadrática Entre conglomerados	GI	Media Cuadrática en el conglomerado	GI
1	806	4	202.012	3	82,9	802
2	995	6	356.188	5	67,98	989
3	3.609	7	970.127	6	76,5	3.605

N=números de muestras evaluadas en cada lote, Gl= grados de libertad

Figura 2. Diagrama de cajas con la distribución de los conglomerados en cada lote según el porcentaje de positividad para la estandarización de la ELISA indirecta



Las cajas representan la distribución de cada conglomerado en cada uno de los lotes en **A** lote 1, n=806, en **B** lote 2, n=995 y en **C** lote 3 , n=3609.

Validación

Sensibilidad y Especificidad

En una muestra representativa de 359 sueros se realizó el ensayo de ELISPOT-MNT50 como prueba de referencia para determinar la sensibilidad y especificidad de cada uno de los lotes de la ELISA IgG indirecta. Esta muestra representativa se calculó en el programa EpiInfo v6.0 sobre la base de un universo de 5.000 muestras de escolares evaluadas, se consideró un error de muestreo del 5%, un nivel de confianza del 95% y prevalencia del 50%. Para una población de 357 muestras a evaluar. La selección se hizo al azar por muestreo aleatorio simple en Microsoft Excel, la muestra se distribuyó en forma proporcional entre positivos y negativos según el resultado de la ELISA IgG y por el lote con el que habían sido procesadas.

Las muestras quedaron distribuidas así: n=77 lote 1; n=128 correspondían al lote 2, n=154 al lote 3. Desafortunadamente debido al alto número de positivos (96,6%) detectados por el MNT-50, solo se encontraron 12 muestras negativas, de las cuales habían sido procesadas con el lote 1, una con el lote 2 y seis con el lote 3. La Sensibilidad y Especificidad, así como los valores predictivos positivo y negativo fueron calculados. Sin embargo estos datos deben ser vistos con precaución debido a la falta de muestras representativas con resultado negativo. Se encontró que todos los lotes presentaban una sensibilidad por debajo del 70% aunque un buen valor predictivo positivo mayor al 90%. (Tabla 11)

Tabla 11. Descripción de la Sensibilidad y Especificidad de cada lote para la ELISA IgG indirecta

LOTE	S	IC95%	E	IC95%	VPP	IC95%	VPN	IC95%
1	63,9	52,1—75,7	20	0,0—65,1	92	83,5—100	3,7	0,0—12,7
2	26,7	18,7—34,9	100	50—100	100	98,5—100	1,1	0,0—3,6
3	59,7	51,4—68,1	33,3	0,0—79,4	95,6	90,7—100	3,3	0,0—8,7

S: Sensibilidad, E: Especificidad, IC95% Intervalo de confianza del 95%, VPP: Valor predictivo positivo y VPN: valor predictivo negativo.

CAPITULO 4

CARACTERIZACIÓN SERÓLOGICA FRENTE AL VIRUS DENGUE Y ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN ESCOLAR DE MEDELLIN

Metodología

Diseño del estudio

Un estudio longitudinal para monitoreo serológico

Población de estudio.

Selección de la muestra.

La unidad de muestreo primaria fue la escuela de la zona urbana de la ciudad de Medellín. La unidad de análisis fue el escolar matriculado. La información del marco muestral fue el listado de IE oficiales y no oficiales de la zona urbana proporcionadas por la Secretaría de Educación del municipio de Medellín y el listado de los alumnos de las instituciones seleccionadas. Se realizó un muestreo en dos etapas. En la primera se hizo la selección de la unidad de muestreo primaria por muestreo aleatorio simple. En la segunda etapa, se hizo la selección por muestreo aleatorio simple de las unidades de análisis en las escuelas seleccionadas, según la siguiente distribución: IE entre 131 y 300 escolares se estudiaría el 15% de los escolares, y la IE de más de 300 escolares se estudiaría el 10% de los escolares. Solo se incluyeron las IE que tenían primaria y bachillerato.

Las IE seleccionadas y cuyas directivas aceptaron participar fueron: IE-FM, localizada en la comuna Aranjuez, IE-IC en la comuna Villa Hermosa, IE-SJ en la comuna Castilla y IE-JR en la comuna de Robledo. (Figura 3).

Esta muestra representativa se calculó en el programa EpiInfo versión 6.0 sobre la base de un universo de 344.859 escolares de IE Oficiales y 69.429 escolares de IE No Oficiales. Para ambas muestras se consideró un error de muestreo del 5%, un nivel de confianza del 95% y prevalencia del 50%. A la muestra resultante se le agregó un 10% por pérdidas, quedando un total de 422

escolares para cada población, para un total de 844 personas a estudiar. La muestra se distribuyó en forma proporcional según grado escolar: primaria, 42,9% y secundaria y 57,1%.

Los criterios de inclusión para los participantes fueron los siguientes:

- Escolares matriculados en cualquier grado de primaria o bachillerato.
- Consentimiento informado escrito firmado por uno de los padres o acudientes.

Los criterios de exclusión fueron:

- Planear su retiro de la IE en los 12 meses siguientes al inicio del estudio, excepto los estudiantes de undécimo grado.

Adicionalmente se incluyó en el análisis, la población del estudio longitudinal de cohorte para monitoreo de síndromes febriles que consistió en 2.372 escolares en el año 2010 y 1.834 escolares en el año 2011, los muestreos se realizaron entre los meses de mayo y julio de cada año.

En las IE se realizaron dos muestreos serológicos anuales durante el período de estudio. En cada uno de los muestreos serológicos, a los escolares les fue tomada una muestra de sangre de 5 mL. Se recolectaron los datos socio-demográficos y de antecedentes de fiebre 3 meses previos a la toma de la muestra

Técnicas de laboratorio

Detección de anticuerpos IgM e IgG

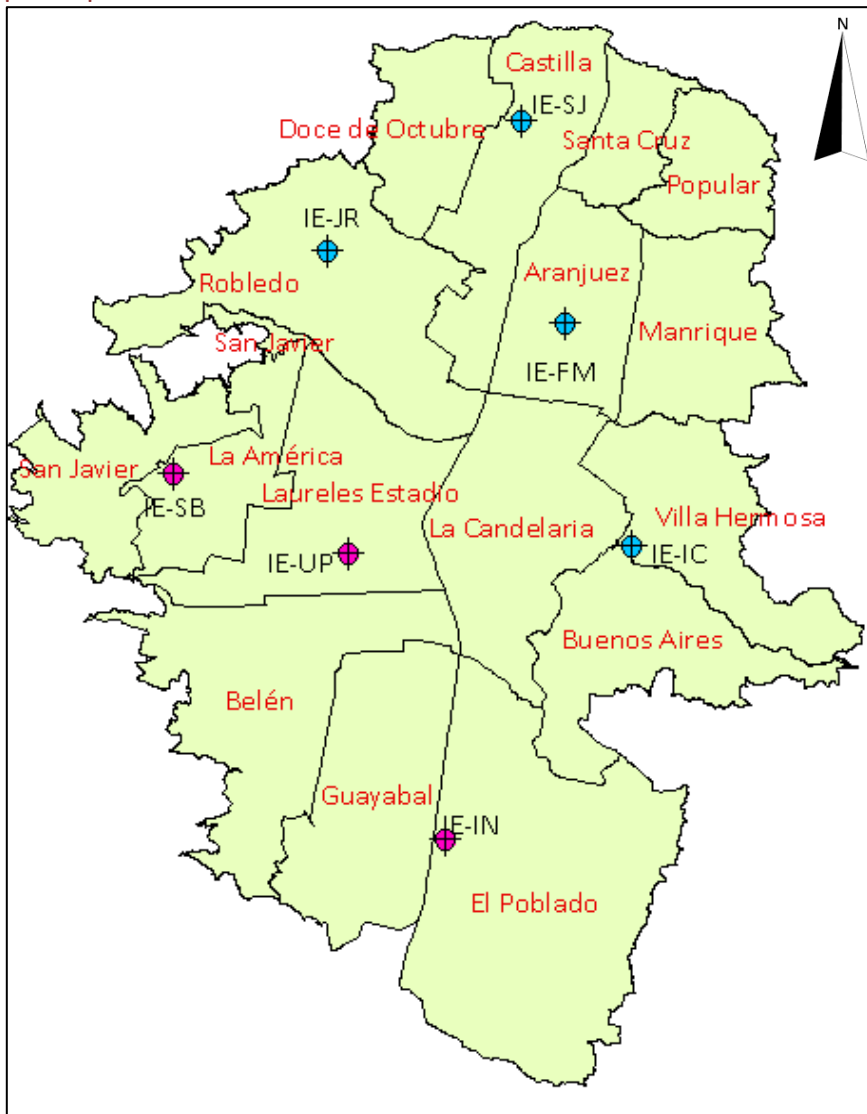
ELISA

Las muestras de suero se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. A las muestras de suero de los escolares fue determinada la presencia de anticuerpos IgM con el estuche comerciales Dengue IgM (Cat N° E-DEN01M, Panbio, Sinnamon Park, Australia) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de anticuerpos IgG se utilizó la Elisa indirecta casera estandarizada en el ICMT y cuyo procedimiento se fue previamente descrito en el capítulo anterior.

ELISPOT-MNT

El ensayo de microneutralización (106). Se realizó en 373 sueros. El procedimiento detallado se describe en el capítulo 1.

Figura 3. Mapa de las comunas de Medellín y ubicación de las Instituciones Educativas participantes en el estudio.



Los nombres de cada comuna son indicados, los círculos de colores indican la ubicación espacial de las Instituciones educativas dentro de la comuna con su respectivo identificador

Resultados

Frecuencia de escolares con presencia de anticuerpos IgM contra el virus dengue años 2010-2012

A una muestra representativa de la población escolar de la ciudad de Medellín de 859 y 848 escolares en los años 2011 y 2012 respectivamente; se determinó la frecuencia de anticuerpos IgM entre marzo y abril del 2011 y entre febrero y marzo del 2012.

Adicionalmente se incluyó en el análisis, la población del estudio longitudinal de cohorte para monitoreo de síndromes febriles que consistió en 2.372 escolares en el año 2010 y 1.834 escolares en el año 2011, los muestreos se realizaron entre los meses de mayo y julio de cada año.

La detección de anticuerpos IgM es un indicativo de una infección reciente por el virus dengue en un periodo de detección que va desde el día 4 hasta 3 meses del desde contacto con el virus. Se encontró que la frecuencia de anticuerpos IgM durante los 3 años evaluados fue variable, para el 2010 fue del 3,0%; para el 2011 del 0,4% y para el 2012 del 3,2% con una diferencia estadísticamente significativa entre los años 2010-2011 y 2011-2012 (χ^2 de tendencia=4,945; $p=0,026$) (Tabla 12).

Durante el año 2010, la caracterización sociodemográfica de la frecuencia de anticuerpos IgM en escolares mostró una mayor frecuencia de estos anticuerpos en los afrocolombianos, en el grupo de edad 15 a 19 años y en el ESE alto, estas diferencias no fueron significativas; la frecuencia de estos anticuerpos fue mayor en la IE-SB, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre IE-SB e IE-IN y entre IE-IN y IE-UP ($p<0,05$).

Durante el año 2011 se observó una mayor frecuencia estadísticamente significativa de anticuerpos IgM en las mujeres comparado con los hombres ($p=0,047$); se observó que el grupo de edad de 15 a 19 años, los mestizos y el ESE alto tuvieron una mayor frecuencia de estos anticuerpos aunque esta diferencia no fueron significativa. Adicionalmente, se observaron diferencia estadísticamente significativa en la frecuencias de estos anticuerpos entre las IE-SJ y la IE-SB ($p=0,021$).

Durante el año 2012 se observó una mayor frecuencia de anticuerpos IgM en las mujeres, en el grupo de edad de 5 a 9 años, en los afrocolombianos y en el ESE medio, para éste año no hubo escolares pertenecientes a ESE alto. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la frecuencia de anticuerpos IgM entre las IE-FM y IE-SJ y entre IE-IC y IE-SJ.

La frecuencia de escolares positivos para anticuerpos IgM contra el virus dengue y que no había presentado un episodio de fiebre durante los 3 meses previos a la toma de la muestra fue 51,5%; 100% y 96,3%, en los años evaluados, es decir, la proporción observada de asintomáticos versus sintomáticos para dengue fue 1:1; 11:0 y 26:1, para los años 2010, 2011 y 2012 respectivamente.

En todos los años la mayor frecuencia de asintomáticos se encontró en el grupo de edad de 10 a 14 años.

Tabla 12. Características sociodemográficas de los escolares con presencia de anticuerpos IgM contra el virus dengue para los años 2010, 2011 y 2012 en la ciudad de Medellín

Año	2010				2011				2012			
Frecuencia de Anticuerpos IgM contra el virus dengue	3,0*				0,4*				3,2*			
	Positivos IgM N=71		Total N=2372		Positivos IgM n=11		Total n=2693		Positivos IgM n=27		Total n=848	
	No.	%	No	%	No.	%	No	%	No.	%	No	%
Género												
Mujeres	37	3,0	1.251	52,7	9	0,6*	1.400	52,0	16	3,6	449	52,9
Hombres	34	3,0	1.121	47,3	2	0,2	1.293	48,0	11	2,8	399	47,1
Raza												
Mestizo	62	2,9	2.146	90,5	11	0,4	2.508	93,1	25	3,1	833	98,2
Afro-colombiano	5	4,7	106	4,5	0	0,0	83	3,1	2	13,3	15	1,8
Grupo de edad (años)												
5-9	19	2,7	692	29,2	2	0,3	590	21,9	10	4,8	207	24,4
10-14	35	2,8	1269	53,5	5	0,3	1521	56,5	14	2,7	514	60,6
15-19	17	4,1	411	17,3	4	0,7	579	21,5	3	2,4	127	15,0
Estrato Socio-Económico												
Bajo	38	2,9	1332	56,2	5	0,4	1.406	52,2	10	2,5	448	52,8
Medio	27	3,1	871	36,7	5	0,4	1.135	42,1	17	4,3	397	46,8
Alto	6	3,7	163	6,9	1	0,7	141	5,2	0	0,0	0	0,0
Institución Educativa												
IN	12	1,4*	836	35,2	2	0,3	649	24,1	N.A	--	--	--
UP	19	3,4	558	23,5	2	0,4	487	18,1	N.A	--	--	--
SB	40	4,1	978	41,2	1	0,1	698	25,9	N.A	--	--	--
FM	N.A	--	--	--	1	0,4	274	10,2	5	1,8	276	32,5
IC	N.A	--	--	--	0	0,0	280	10,4	4	1,3	320	37,7
SJ	N.A	--	--	--	4	1,9	213	7,9	16	8,9	180	21,2
JR	N.A	--	--	--	1	1,1	92	3,4	2	2,8	72	8,5
Asintomáticos vs. sintomáticos	1:1				11:0				26:1			

*= Diferencia estadísticamente significativa valor de $p < 0,05$.

Frecuencia de escolares con presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue años 2010-2012

Se determinó la presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue con el fin de evaluar la exposición de los escolares al virus en algún momento de su vida. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue en los escolares para cada año evaluado; en el 2010 la frecuencia de anticuerpos IgG fue 54,6%; en el 2011 fue 59,3% y en el 2012 fue 64,7%; las diferencias fueron estadísticamente significativa entre 2010 y 2011; 2010 y 2012 y entre 2011 y 2012 (χ^2 de tendencia = 28,042; $p=0,000$) (tabla 13).

Durante el año 2010 la frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue fue significativamente mayor en el grupo de edad de 15 a 19 años (χ^2 de tendencia =112,819; $p=0,000$) y en el ESE bajo (χ^2 de tendencia=21,759; $p=0,000$), también fue mayor la frecuencia de estos anticuerpos en las mujeres y en los mestizos aunque no se encontraron diferencias significativas, adicionalmente se encontró que la frecuencia de estos anticuerpos fue significativamente menor en la IE-UP no oficial comparada con las IE-IN y IE-SB.

Durante el año 2011 la frecuencia de los anticuerpos IgG contra el virus dengue en los escolares, continuo siendo mayor en la mujeres y en el ESE bajo, en este año los escolares de la IE-JR tuvieron la mayor frecuencia de estos anticuerpos sin encontrarse diferencias significativas y al igual que en el año 2010, el grupo de 15 a 19 años tuvo la mayor frecuencia de estos anticuerpos (χ^2 de tendencia=40,554; $p=0,000$).

En el año 2012, las mujeres tuvieron nuevamente la mayor frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue, ésta vez con diferencia estadísticamente significativas comparado con los hombres (χ^2 cuadrado de Pearson=5,729; $p=0,017$), se observó además una mayor frecuencia de estos anticuerpos en los afrocolombianos y en el ESE medio pero las diferencias no fueron significativas. Durante éste año el grupo de edad con una frecuencia significativamente mayor de estos anticuerpos fue el de 10 a 14 años (χ^2 de tendencia= 12,334; $p=0,000$) y los escolares de las IE-SJ tuvieron también una frecuencia significativamente mayor de estos anticuerpos comparados con los de la IE-IC y la IE-JR (χ^2 cuadrado de Pearson=21,226; $p=0,000$).

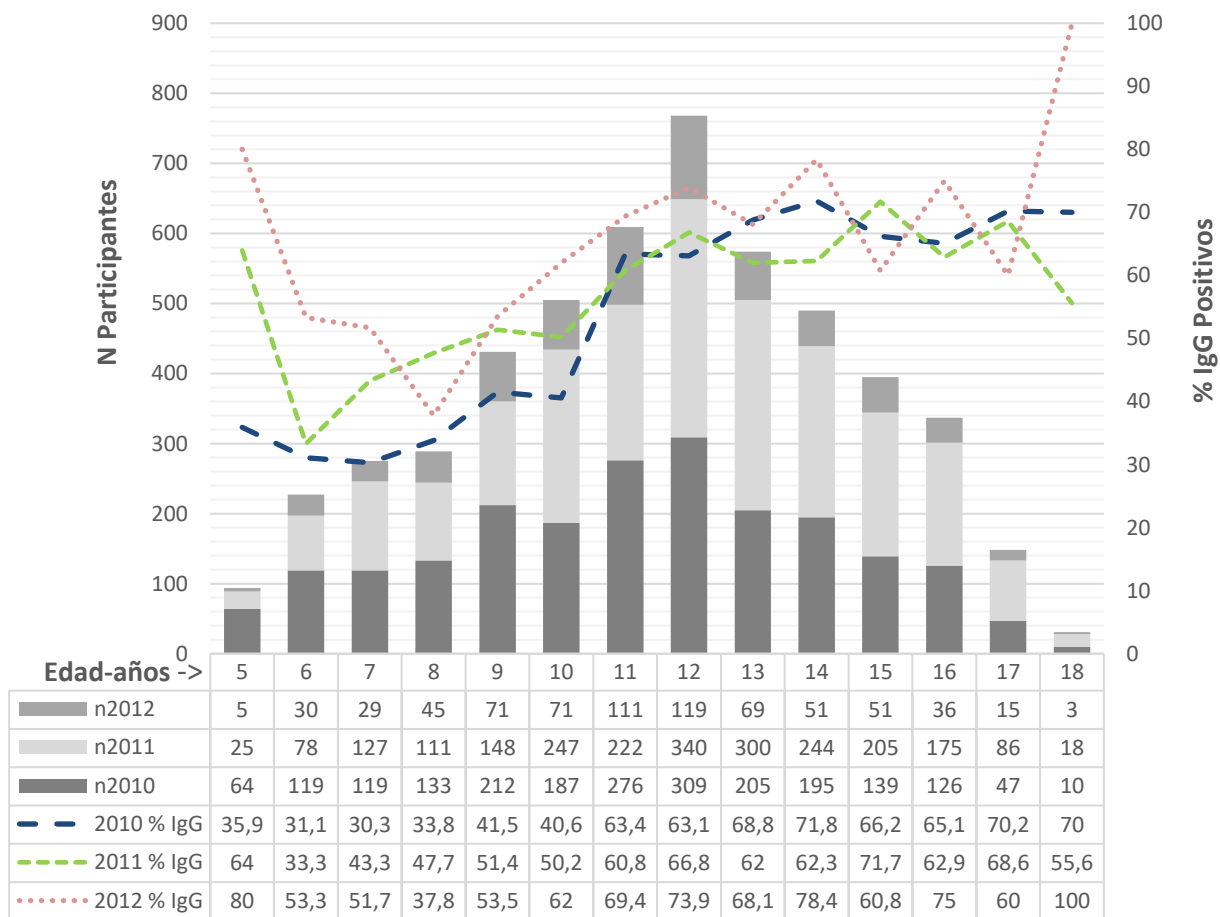
Se observó una tendencia en el aumento de la de frecuencia de anticuerpos IgG y la edad de los escolares en los tres años evaluados (Figura 3). El promedio de edad de los individuos seropositivos fue significativamente mayor en todos los años comparado con los individuos seronegativos, los promedios de edad en cada año fueron: 12,0 \pm 2,8 vs 10,3 \pm 3,1 ($p=0,00$), 12,3 \pm 2,9 vs 11,4 \pm 3,1 ($p=0,00$) y 11,7 \pm 2,7 vs 10,8 \pm 2,8 ($p=0,00$) respectivamente.

Tabla 13. Características sociodemográficas de los escolares y presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue para los años 2010, 2011 y 2012 en Medellín

Año	2010				2011				2012			
Frecuencia	54,1*				59,8*				64,6*			
Anticuerpos IgG contra el virus dengue	Positivos IgG		Total		Positivos IgG		Total		Positivos IgG		Total	
	n=1072		n=1983		n=1314		n=2197		n=448		n=693	
	No.	%	No	%	No.	%	No	%	No.	%	No	%
Género												
Mujeres	567	55,1	1.029	51,9	715	61,2	1.169	53,2	251	68,8*	365	52,7
Hombres	505	52,9	954	48,1	599	58,3	1.028	46,8	197	60,1	328	47,3
Raza												
Mestizo	1.027	54,4	1.888	95,2	1.272	59,7	2.126	96,8	438	64,5	679	98,0
Afrocolombiano	45	47,4	95	4,8	42	59,2	71	3,2	10	71,4	14	2,0
Grupo de edad (años)												
5-9	206	34,4	599	30,2	215	47,3	455	20,7	89	50,3	177	25,5
10-14	661	61,5	1.075	54,2	782	61,3	1.275	58,0	288	70,2*	410	59,2
15-19	205	66,3*	309	15,6	317	67,9*	490	21,3	71	67,0	106	15,3
Estrato Socio-Económico												
Bajo	643	58,2*	1.104	55,7	746	60,7	1228	55,9	209	61,3	341	49,2
Medio	375	50,2	747	37,7	511	59,0	866	39,4	238	68,2	349	50,4
Alto	54	41,2	131	6,6	53	55,8	95	4,3	0	0,0	0	0,0
Institución Educativa												
IN	393	58,8	668	33,7	294	50,9	483	22,0	N.A	--	--	--
UP	208	42,6*	488	24,6	205	57,3	358	16,3	N.A	--	--	--
SB	471	57,0	827	41,7	366	57,2	640	29,1	N.A	--	--	--
FM	N.A	--	--	--	151	55,5	272	12,4	123	68,3	180	26,0
IC	N.A	--	--	--	99	61,1	162	7,4	167	57,0	293	42,3
SJ	N.A	--	--	--	136	70,1	194	8,8	123	77,4*	159	22,9

JR	N.A	--	--	--	63	71,6	88	4,0	35	57,4	61	8,8
*Diferencia estadísticamente significativa; NA= no aplica.												

Figura 3. Frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue por edad en los años 2010, 2011, y 2012 en escolares de Medellín



AÑO	Chi ² de tendencia	Valor de p
2010	142,584	<i>p=0,000</i>
2011	49,620	<i>p=0,000</i>
2012	14,099	<i>p=0,000</i>

Seroconversión de anticuerpos IgG en muestras pareadas de escolares periodo 2010-2011 y 2011-2012

A un total de 1835 escolares fue posible realizar detección de anticuerpos IgG contra el virus dengue en muestras de sangre pareadas en los años del estudio, de los cuales 1.785 escolares participaron en el periodo 2010-2011 y 384 escolares participaron en el periodo 2011-2012

En la comparación entre los dos periodos se observó que el grupo de escolares negativo disminuyó del 26,8% al 21,9%, en el 2011-2012. Se observó un aumento de 42% a 52,9% del grupo de escolares positivo en ambas muestras. La tasa de seroconversión disminuyó del 16,5% al 10,4% en el segundo periodo y la seroreversión se mantuvo constante entre los dos periodos del 14,6% y 14,8% (tabla 14).

La edad en cada uno de estos grupos varió significativamente en ambos periodos (χ^2 de Pearson=13,84, $p=0,000$ y χ^2 de Pearson= 15,57, $p=0,000$), el promedio de edad de los escolares que permanecieron negativos fue $10,2\pm 2,7$ y $10\pm 3,3$ en cada periodo. El promedio en el grupo que permaneció positivo en ambas muestras fue de $12\pm 2,6$ y $11,5\pm 2,6$ ($p=0,03$), en relación a la seroconversión el promedio de edad fue $10,3\pm 3$ y $13,3\pm 2$ ($p=0,00$) y la para la seroreversión fue de $11,2\pm 3$ y $10,2\pm 2,7$ ($p=0,01$).

Durante los dos periodos con relación al género el mayor porcentaje de seroconversión se observó en los hombres y en la raza afrocolombiana, esta última fue estadísticamente significativa comparada con los mestizos en el periodo 2010-2011.

La edad donde la seroconversión fue mayor se observó en los escolares de 7 años en el periodo 2010-2011 con un 41,8% y en los escolares de 17 años durante el periodo 2011-2012 con el 40%.

Tabla 14. Porcentaje de seroconversión y seroreversión de anticuerpos IgG contra el virus en escolares de Medellín durante los periodos 2010-2011 y 2011-2012

Periodo año	2010-2011		2011-2012	
	N=1451		N=384	
	% seroconversion	% Seroreversión	% seroconversion	% Seroreversión
	16,5	14,6	10,4	14,8
Sexo				
Mujeres	15,3	14,8	8,3	14,6
hombres	18,0	14,5	12,5	15,1
Raza				
Mestizo	16,3	14,9	10,3	14,9
Afro-Colombiano	27,5	11,8	33,3	16,7
Otra	6,5	9,7	0,0	11,1
Edad en años				
5-6	15,4	17,3	0,0	19,0
6-7	20,8	11,1	21,1	9,5
7-8	41,8	16,4	4,2	19,0
8-9	24,1	9,2	10,0	23,8
9-10	21,1	17,0	4,8	19,0
10-11	22,7	10,9	13,0	38,1
11-12	14,1	14,1	17,5	38,1
12-13	11,8	15,9	8,5	61,9
13-14	12,3	14,8	3,2	14,3
14-15	11,9	17,0	10,3	19,0
15-16	11,2	19,4	7,1	4,8
16-17	7,7	9,2	15,4	4,8
17-18	26,7	6,7	40,0	0,0
*Porcentaje de seroconversión positivo y negativo fue calculado usando como denominador el número total de escolares en cada categoría de la variable				

Caracterización de la respuesta de anticuerpos contra el virus dengue mediante el ensayo de microneutralización en placa adaptado a elispot: ELISPOT-MNT50

El ensayo de microneutralización ELISPOT (ELISPOT-MNT) cuya metodología fue descrito previamente, fue utilizado con el objetivo de caracterizar la respuesta de anticuerpos mediante la titulación por de MNT50 el cual es definido como la dilución del suero donde se reduce el 50% de las placas cuando se compara con los pozos control que solo poseen el virus. Los títulos de MNT50 menores a $<1:20$ se consideraron indetectables.

En una muestra representativa de 357 escolares que correspondía a 373 sueros procesados por la Elisa IgG se realizó la caracterización de la respuesta de anticuerpos mediante la titulación por de MNT50.

La edad promedio de los escolares evaluados fue de 11 ± 3 , el 55,2% eran mujeres, el 90,2% era mestizos, el 5% afrocolombianos. Se encontró que el 96,9% (346/357) presentaban títulos detectables de anticuerpos contra uno o varios serotipo del virus dengue.

Las muestras se encontraron distribuidas en los 3 años así: 267 del año 2010, 93 del año 2011 y 13 del año 2012. En el año 2010 se observó que la mediana del título de anticuerpos neutralizantes fue mayor para el DENV-4 (mediana=1308 Q1-Q3=177—3166). En el 2011 fue mayor para DENV-1 (mediana=1437 Q1-Q3=80—5642) y en el 2012 para DENV-4 (mediana=5693 Q1-Q3=1085—6294). Al comparar cada uno de los serotipos entre los años 2010 y 2011 de donde provenían la mayoría de las muestras evaluadas se encontró un aumento significativo en la mediana del título de anticuerpos neutralizantes para DENV-1 ($p=0,01$) mientras que para el DENV-2 se observó una disminución no significativa y para DENV-3 y DENV-4 los títulos de anticuerpos neutralizantes se mantuvieron relativamente estables (Figura 4).

Se encontró que a 23 escolares se le evaluaron múltiples muestras por el ensayo de microneutralización, de los cuales a 16 escolares se le evaluaron la dos muestras del estudio de monitoreo serológico anual y a 7 escolares se tenía el resultado de tres muestras que consistían en las muestras aguda y convaleciente colectadas durante el estudio longitudinal por un episodio de síndrome febril (negativos por RT-PCR y ELISA IgM) y una de las muestras anuales. Al caracterizar la respuesta inmune al virus de estos escolares, se encontró que solo un escolar permaneció negativo (4,3%) el resto era positivo para uno o varios serotipos, el 21,7% se le observó disminución en el título de anticuerpos en las muestras pareadas, mientras que el 73,9% (17/23) tuvieron contacto con el virus dengue lo cual fue confirmado por un aumento cuádruple en el título de anticuerpos neutralizantes entre las muestras pareadas. La respuesta inmune se

caracterizó por una respuesta inmune secundaria y heterotípica, el aumento cuádruple se observó principalmente contra el DENV-4 (4/17), DENV-1/DENV-4 (4/17), DENV-1/DENV-3/DENV-4 (3/17), DENV-1/DENV-2/DENV-3 (2/17). La descripción completa de este grupo de escolares se observa en la Tabla 15.

Figura 4. Título MNT50 de los serotipos del virus dengue en escolares de la ciudad de Medellín durante los años 2010, 2011, 2012

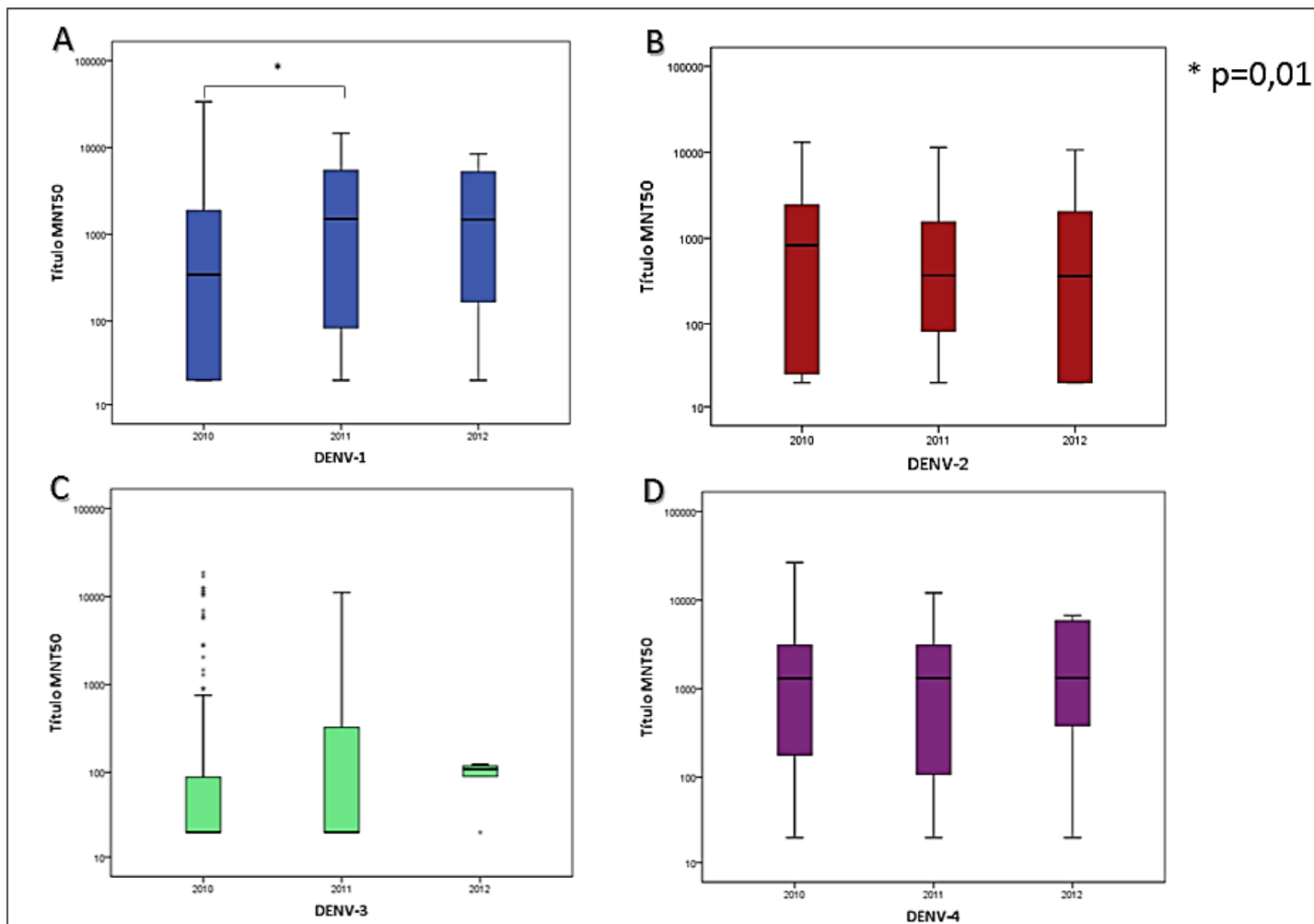


Figura 5. El título MNT50: ensayo de microneutralización en placa 50 para el serotipo DENV-1 se muestra en A, DENV-2 en B, DENV-3 en C y DENV-4 en D, las cajas representan la mediana, y el rango intercuartilico Q1 y Q3 de cada serotipo en cada uno de los años evaluados. N=267 para DENV-1, DENV-2, DENV-4 y N=163 para DENV-3 en el 2010; N=93 para DENV-1, DENV-3, DENV-4 y n=88 para DENV-2 para el 2011; N=13 para DENV-1, DENV-3, DENV-4 y N=11 para DENV-2 en el 2012.

Tabla 15. Descripción respuesta inmune contra el virus dengue por MNT50 en escolares de la ciudad de Medellín durante los años 2010, 2011, 2012

ID	GENERO EDAD	FECHA	Tipo de Muestra	ELISA IgM	TITULO MNT50				TIPO DE RESPUESTA INMUNE	TIPO DE INFECCIÓN
					DENV1	DENV2	DENV3	DENV4		
I0028	Mujer 14	Ago-10	M1	Negativo	<20	164	<20	666	Heterotípica D1/D3/D4	secundaria
			M2	Negativo	1408	<20	88	1330		
S0792	Hombre 5	jun-10	M1	Negativo	<20	<20	<20	823	Heterotípica D1/D3/D4	secundaria
			M2	Negativo	1548	1380	<20	1385		
U0097	Mujer 12	may-10	M1	Negativo	<20	<20	<20	6370	Heterotípica D1/D2/D3	secundaria
			M2	Negativo	5178	355	84	1582		
S0724	Hombre 8	jun-10	M1	Negativo	210	170	<20	160	Heterotípica D1/D4	secundaria
			M2	Negativo	1673	85	<20	1369		
S0306	Mujer 12	jun-10	M1	Negativo	687	782	SD	895	Heterotípica D4	secundaria
			M2	Negativo	236	175	<20	12044		
S0417	Hombre 14	jun-10	M1	Negativo	1774	1620	SD	1767	Heterotípica D4	secundaria
			M2	Negativo	1650	<20	<20	5856		
S0450	Mujer 7	jun-10	M1	Negativo	5736	6346	SD	<20	Heterotípica D4	secundaria
			M2	Negativo	6061	86	<20	1570		
S0833	Hombre 5	jul-10	M1	Negativo	6438	52	<20	6594	Heterotípica D2	Infección no reciente
			M2	Negativo	443	407	<20	6534		
U0280	Mujer 9	may-10	M1	Negativo	33602	<20	<20	<20	Homotípica D4	secundaria
			M2	Negativo	<20	<20	<20	2808		
IC061	Hombre 15	feb-11	M1	Negativo	<20	5485	<20	<20	Heterotípica D1/D4	secundaria
			M2	Negativo	167	2707	<20	644		
FM271	Mujer 10	feb-11	M1	Negativo	<20	<20	<20	<20	N.A	Negativo
			M2	Negativo	<20	<20	<20	<20		
JR006	Hombre 9	mar-11	M1	Negativo	1337	7321	6307	392	Heterotípica	Infección no reciente
			M2	Negativo	1484	SD	<20	382		
FM213	Mujer 10	feb-11	M1	Negativo	1514	1549	6998	1314	Heterotípica D1/D2/D4	secundaria
			M2	Negativo	5877	6024	1505	5859		
IC174	Hombre 9	feb-11	M1	Negativo	6823	1330	112	5142	Heterotípica	Infección no reciente
			M2	Negativo	<20	362	<20	5277		
FM268	Mujer 9	feb-11	M1	Negativo	7024	5984	<20	382	Heterotípica D3	secundaria
			M2	Negativo	3159	10671	10240	193		
FM204	Hombre 15	feb-11	M1	Negativo	7374	6140	5156	107	Heterotípica D4	secundaria
			M2	Negativo	8455	1526	437	458		
S0193	Mujer 15	jul-10	MA	Negativo	45159	4877	12923	55809	Heterotípica	Infección no reciente
			MC	Negativo	48567	4764	9545	5471		
		jun-11	M2	Negativo	6046	142	101	5164		
S0638	Hombre 6	sep-10	MA	Negativo	3633	9872	33	79	Heterotípica D1/D4	secundaria
			MC	Negativo	59847	2660	36	353		
		jun-11	M2	Negativo	5505	99	<20	6077		

ID	GENERO EDAD	FECHA	Tipo de Muestra	ELISA IgM	TITULO MNT50				TIPO DE RESPUESTA INMUNE	TIPO DE INFECCIÓN
					DENV1	DENV2	DENV3	DENV4		
I0019	Mujer 16	ago-10 may-11	M1	Negativo	<20	84	<20	1467	Heterotípica D1/D3/D4	secundaria
			MA	Negativo	1396	44	1522	2041		
			MC	Negativo	1576	36	1422	3625		
S0316	Hombre 12	jun-10 ago-10	M1	Positivo	101	1930	SD	1340	Heterotípica D1/D2/D3	secundaria
			MA	Positivo	3568	2157	3822	1376		
			MC	Positivo	3819	3319	17155	319		
S0594	Mujer 9	jun-10 mar-11	M1	Negativo	3070	3552	SD	3000	Heterotípica D1/D4	secundaria
			MA	Negativo	20916	2827	3938	5879		
			MC	Negativo	2035	1793	2919	1480		
U0018	Hombre 14	may-10 jun-10	M1	Negativo	5608	<20	<20	<20	Heterotípica D2/D3/D4	secundaria
			MA	Negativo	1753	15893	4573	3220		
			MC	Negativo	38	1046	<20	<20		
U0006	Hombre 15	may-10 dic-10	M1	Negativo	7053	<20	<20	<20	Heterotípica D2/D3	secundaria
			MA	Negativo	44	3546	662	16		
			MC	Negativo	164	2577	38	<20		

ID: identificación de la muestra; Fecha: Mes-año. Tipo de muestra M1 y M2: muestras del estudio de corte tomadas con un intervalo de 1 año; MA: muestra aguda; MC: muestra convaleciente tomadas con un intervalo aprox. De 15 días; TÍTULO MNT50 : Título de anticuerpos neutralizantes para cada serotipo, en negrilla se indica el título con aumento cuádruple en el título de anticuerpos. Tipo de Respuesta inmune: se indica el serotipo donde se observó aumento cuádruple en el título de anticuerpos. Tipo de infección: según el estatus inmune en la primera muestra: SD: sin dato. N.A: No aplica

Socialización del estudio y Material educativo

En las escuelas participantes, los escolares, los padres y el personal educativo fueron capacitados acerca de dengue, modo de transmisión, medidas de control del vector, manejo de la enfermedad y signos de alarma, lo cual se realizó conferencias y metodologías lúdicas con los escolares (juegos didácticos) y se distribuyeron folletos educativos sobre el dengue a escolares y profesores.

Se entregaron los resultados positivos y negativos a cada participante con explicación de los resultados. Circular emitida por el rector de cada IE con los resultados del estudio. Entrega de un informe a cada rector y al secretario de educación municipal sobre los resultados del estudio.

CAPITULO 5

ESTUDIO ENTOMÓLOGICO EN LAS VIVIENDAS DE LOS ESCOLARES, LAS IE Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LOS CASOS DE DENGUE

Metodología

Índices de infestación por *Aedes aegypti*

En las casas de los pacientes positivos para dengue y algunos negativos que participaron en el estudio de cohorte y en las instituciones educativas elegidas, se realizó un muestreo de las poblaciones de *Aedes aegypti*, por medio de las encuestas de larvas, de pupas y de adultos siguiendo los parámetros de la OMS (7).

Inspección de las viviendas. Se realizó inspección de las casas desde la parte externa hasta el interior de la vivienda.

Encuesta de larvas y pupas de *Aedes aegypti*. Se realizó búsqueda activa y registro de larvas y pupas en todos los recipientes que contengan agua dentro de las viviendas. Las larvas colectadas fueron dispuestas en cápsulas (1-5 larvas) con alcohol al 70% y posteriormente se llevaron al laboratorio de entomología del ICMT, para ser identificadas por medio de claves taxonómicas específicas.

Encuesta de mosquitos adultos

Para la captura de mosquitos adultos se utilizó el método de cebo humano y captura en reposo, siguiendo la metodología de la OMS (7).

- Cebo humano: se realizaron capturas intradomiciliarias en las casas, con un tiempo de exposición de 20 minutos por casa. Los mosquitos se colectaron con ayuda de aspiradores bucales y se depositaron en frascos plásticos rotulados para cada vivienda.
- Captura en reposo: se realizó una búsqueda minuciosa de adultos de *A. aegypti*, durante las horas del día (8:00 a 17:00 horas), dedicando como mínimo 20 minutos de búsqueda en cada vivienda. La búsqueda se realizó en el peridomicilio (paredes y superficies aledañas a depósitos de agua), e intradomicilio (todas las paredes de la casa, objetos colgados y en rincones húmedos y oscuros).

Todo el material recolectado fue llevado al ICMT con el fin de ser identificado y se ingresó a una base de datos.

Análisis de resultados

Se calcularán los índices de riesgo de infestación por *Aedes aegypti* de la siguiente manera:

Índice de infestación viviendas, para larvas (IIV):

$IIV = \text{No. viviendas positivas} / \text{No. viviendas inspeccionadas} * 100$

Índice de infestación de depósitos (IID):

$IID = \text{No. de depósitos positivos} / \text{No. de depósitos inspeccionados} * 100$

Índice de infestación de Breteau (IIB):

$IIB = \text{No. de depósitos positivos} / \text{No. de viviendas inspeccionadas} * 100$

Índice de infestación de viviendas para adultos (IIA):

$II = \text{No. de viviendas positivas} / \text{No. viviendas inspeccionadas} * 100$

Según los índices de infestación se da el criterio de clasificación del riesgo de transmisión de la siguiente manera: Riesgo bajo (IIV menor a 4%, IID menor a 3% y IIB menor de 5%). Riesgo alto (IIV mayor o igual a 4%, IID mayor o igual a 3% y IIB mayor o igual a 5%).

Sistema de información geográfica

En las IE y en las casas de los casos positivos y algunos negativos se tomaron las coordenadas geográficas por medio de GPS (Garmin co) con precisión de 3 metros. Adicionalmente, se recolectaron las direcciones de los escolares participantes en el año 2010. Con la oficina de planeación municipal de Medellín se obtuvieron mapas digitalizados de la zona de estudio sobre los cuales se descargó la información de casos de dengue por viviendas, índices de adultos, depósitos, viviendas y Breteau. El procesamiento se realizó con el software ArcGIS 10.3.1. Todos los datos se integraron en un sistema de información geográfica (SIG), el cual tenía la información espacial de los vectores y la distribución de los casos, con el fin de explicar y predecir la distribución geográfica de la enfermedad.

Adicionalmente, de los 1803 escolares participantes en el año 2010 se recuperó la dirección de sus casas, y junto con el resultado de la ELISA IgG, se tomó una muestra representativa de la población entre 5 y 19 años para realizar un mapa con la frecuencia de anticuerpos IgG de las comunas: Laureles Estadio, la América, La Candelaria, Robledo, Belén, Castilla, Aranjuez, Santa Cruz, Guayabal y San Javier de la ciudad de Medellín.

RESULTADOS

Se realizaron 94 visitas domiciliarias para realizar el levantamiento de los índices entomológicos. Las 94 viviendas estaban distribuidas en 37 barrios ubicados en las comunas 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 del municipio de Medellín. De las casas encuestadas, 67 (71,27%) fueron negativas a la presencia de larvas y adultos de *Aedes aegypti* y 27 casas (28,7%) tuvieron presencia de infestación por *Ae. Aegypti*. Al analizar la información por comunas de la ciudad de Medellín, se evidenció que los índices entomológicos de viviendas son altos en las comunas 4, 5, 9 y 11 y el índice de adultos es igualmente alto en las comunas 4, 9, 10, 13, 14 y 16. El 13,83% del total de viviendas visitadas fueron positivas para larvas de *Ae. Aegypti*, las cuales se encontraban en los barrios de San Javier, Caicedo, Laureles, Miranda, Robledo, Pedregal y Girardot. El 20,2% del total de viviendas visitadas fueron positivas para adultos de *Ae. Aegypti*, las cuales se encontraban en los barrios Belén, San Javier, Simon Bolívar, Laureles, Caicedo, Poblado, Los Angeles, Centro, Antonio Nariño, El Bosque. En el 5,32% del total de viviendas visitadas fueron positivas tanto para larvas como para adultos de *Ae. Aegypti*, las cuales se encontraban ubicadas en los barrios San Javier, Laureles y Caicedo (Figura 5).

Aunque el tamaño muestral no fue el adecuado para realizar análisis con significancia estadística, se logra evidenciar que hay algunas zonas de mayor riesgo de transmisión de dengue, como las comunas 13, 5 y 6, situación que se logra corroborar con los hallazgos de los casos con evidencia de infección reciente por el virus dengue, los cuales se agruparon en estas comunas.

En 6 de las 7 Instituciones Educativas se hizo estudio entomológico. En cuatro IE se observaron los siguientes criaderos de *Aedes aegypti*, dos tanques, un tanque elevado, una caneca, una botella y una fuente decorativa. Se capturaron en las 6 IE adultos de *Ae. Aegypti* y en tres larvas de *Ae. Aegypti*, para un índice de adultos de 100% y un índice larvario de 50%.

Distribución espacial de los casos

Los escolares con síndrome febril detectados en el estudio longitudinal se distribuyeron en 12 de las 16 comunas de Medellín, con mayor confluencia en la comuna de San Javier, área de influencia de la IE SB. En contraste los escolares con síndrome febril de las IE UP (no oficial) y la IE IN, estaban dispersas en toda la ciudad. Los casos confirmados de dengue del estudio longitudinal estaban distribuidos en 6 comunas. En la distribución espacial de los escolares seropositivos para Ac IgM se observan dos conglomerados, uno en la comuna 13 y el otro en la comuna 4, área de influencia de las IE SB y IE-FM. En el resto del área de estudio la distribución no sigue un patrón espacial

específico de los casos. Con relación a los índices de depósitos, se observó en predominio del riesgo medio y bajo, solo se detectó riesgo alto en la comuna de Laureles (Figura 5). Predominó la ausencia de mosquitos adultos por la dificultad del método de búsqueda, sin embargo en las comunas 8 y 13 la presencia de adultos, evidencia la elevada infestación por *A. aegypti*. Al sobreponer los casos de dengue con el índice de depósitos se observa que en las comunas 13 y 4 donde hay mayor agrupación de casos el índice de depósito es de bajo y mediano riesgo según los criterios de la OMS (7).

La mayor frecuencia de escolares con anticuerpos IgG se observó en las comuna de San Javier (56,7%), seguido de Guayabal 56,4% , Aranjuez (53%) y Santa Cruz (52,2%), aunque no se observa un patrón distribución o diferencias significativas entre las comunas (Figura 6).

Figura 5. Mapa de Medellín con la ubicación de escolares positivos para la infección dengue y los índices de depósito de sus viviendas, 2010.

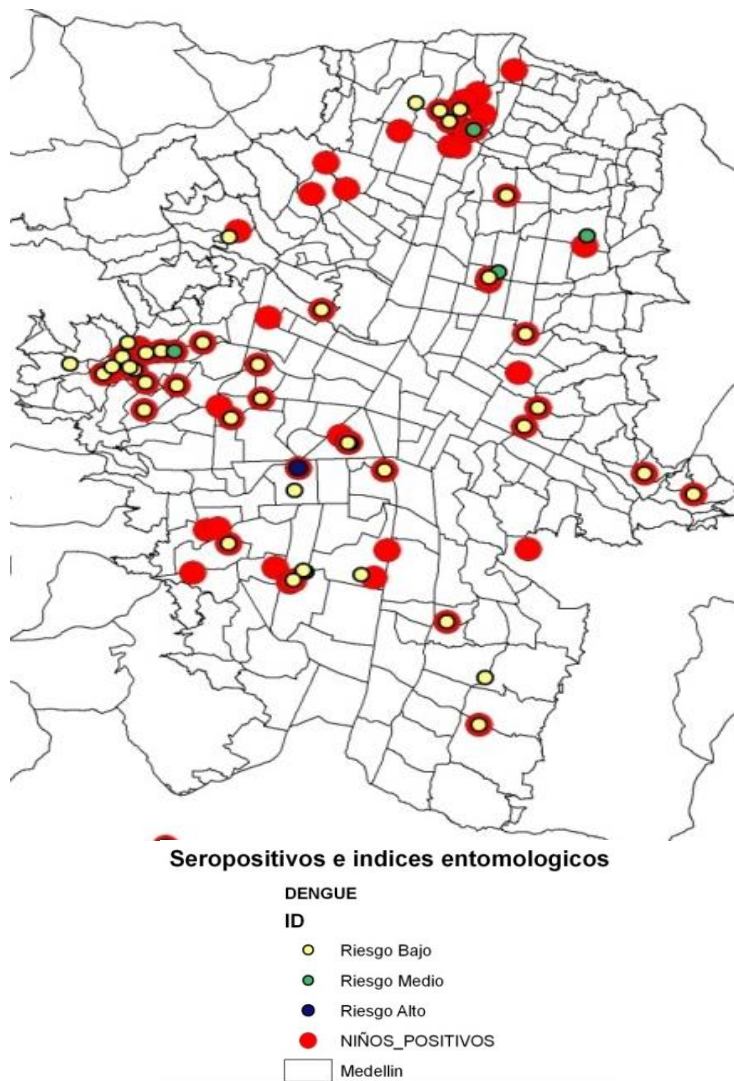
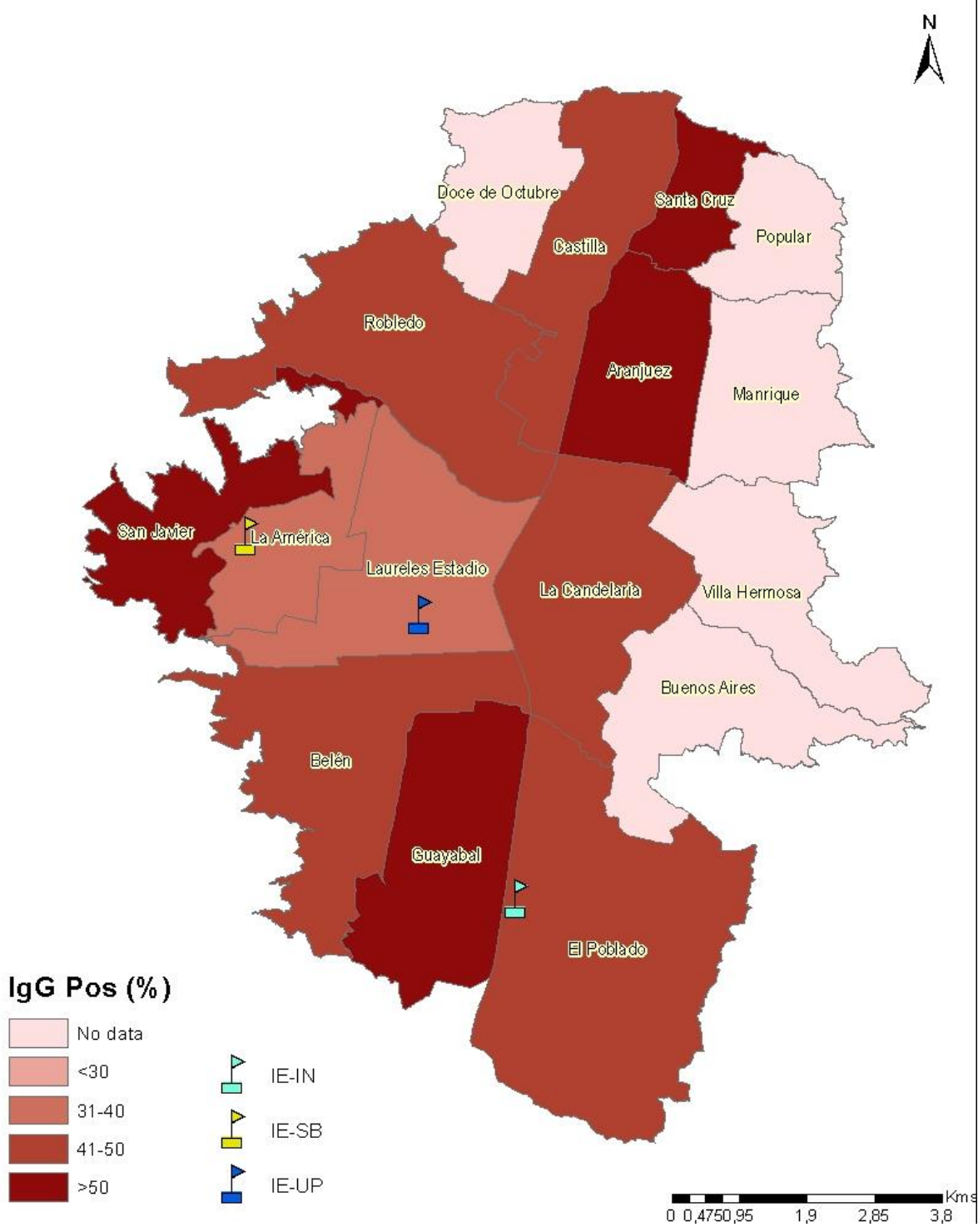


Figura 6. Mapa de Medellín con la frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue de escolares en las comunas de la ciudad de Medellín año 2010



Estudio serológico en contactos familiares de los escolares

En las visitas a las viviendas fueron captados 214 familiares, entre positivos y negativos de los cuales 7 (3,3%) presentaron anticuerpos IgM contra el virus del dengue. Cuatro de ellos eran familiares de escolares positivos de la IE UP y tres eran familiares de escolares positivos de la IE FM. Ninguno de los familiares presentó síntomas en el momento de la toma de la muestra.

CAPITULO 6

CONOCIMIENTOS, APTITUDES Y PRÁCTICAS SOBRE DENGUE EN ACUDIENTES DE LOS ESCOLARES

Metodología

Diseño del estudio

Un estudio de corte transversal para la evaluación de los conocimientos, aptitudes y prácticas de los acudientes de los escolares mediante la aplicación de una encuesta.

Población de estudio.

La población de estudio estuvo constituida por 1.996 padres de familia y acudientes de estudiantes de primaria y bachillerato de IE oficiales IE-SB e IE-IN y la IE-UP (No Oficial). La selección de los padres de familia fue por conveniencia.

Con el objetivo de determinar los conocimientos, actitudes y prácticas que tenían sobre el dengue los acudientes de escolares de las tres instituciones educativas del estudio de cohorte. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, mediante la aplicación de una encuesta para evaluar los conocimientos, aptitudes y prácticas de 1.996 padres de familia y acudientes de escolares durante el 2010

Cada una de las muestras de sangre tomada en el estudio de monitoreo serológico del año 2010, estuvo acompañada por una encuesta que estaba dividida en dos secciones una primera sección donde se contemplaba toda la información socio demográfica e información clínica relevante de cada participante, una segunda sección consistía en una encuesta tipo CAP con trece preguntas cerradas, orientadas al conocimiento, actitudes y prácticas sobre el dengue: modo de transmisión, signos y síntomas del dengue, medidas de prevención, manejo del paciente y percepción de factores de riesgo de dengue en la vivienda y su entorno (Anexo 3).

La encuesta estaba dividida en tres secciones una primera sección donde se contemplaba toda la información socio demográfica del escolar donde fueron medidas las siguientes variables: Institución educativa, grado, barrio, estrato socioeconómico, EPS (afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud), edad, sexo, raza, también se preguntó sobre el antecedente de dengue

alguna vez, presencia de fiebre en los últimos 3 meses y en los últimos 7 días. Una segunda sección con datos correspondientes y medidos al acudiente (Parentesco, Edad, Número de personas en la vivienda y nivel educativo). La tercera sección estaba integrada por 13 preguntas cerradas, orientadas al conocimiento, actitudes y prácticas sobre dengue: modo de transmisión, signos y síntomas del dengue, medidas de prevención, manejo del paciente y percepción de factores de riesgo de dengue en la vivienda y su entorno. Cada pregunta tenía varias opciones de respuesta y estas a su vez medidas en forma dicotómica con opciones de “Si” ó “No”. Finalmente fue sometida a validez de contenido por personal experto en la temática (Anexo 2).

RESULTADOS

Caracterización sociodemográfica de los encuestados

Fueron aplicadas un total de 1 996 encuestas, distribuidas de la siguiente manera en las tres IE: 739 (37%) en la IE-SB, 740 (37,1%) en la Institución IE-IN y 517 (25,9%) en la IE-UP. La población estudiada estuvo constituida por adultos mayores de 17 años, con un promedio de edad de $38,8 \pm 8,5$ años. La mitad de los participantes tenían 38 años o menos. La edad más frecuente fue 35 años oscilando entre 18 y 84 años. Los grupos de edad de mayor participación fueron el de 28 a 37 y el de 38 a 47 años con el 37,8 % respectivamente. Con relación al parentesco del encuestado con el escolar 1.595 (79,9%) eran madres, 244 (12,2%) eran padres y 143 (7,2%) eran otro acudiente. No se obtuvo información de esta variable en 14 encuestados. El nivel educacional más frecuente fue la educación básica (primaria y secundaria) con el 56,7 %, seguido de la educación superior (universidad, tecnología y postgrados) con el 40 %. No tenían ningún nivel educativo el 1,2 % de los encuestados y no se obtuvo información de esta variable en 43 personas (2,2%). El estrato socio económico predominante fue el estrato bajo con el 36,9 % seguido del estrato medio bajo con el 29,4 % de frecuencia (Tabla 14). El promedio de las personas que convivían con los encuestados fue de 4,54 habitantes por vivienda.

Se hizo la comparación de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre dengue, según la persona que respondió la encuesta, el grupo de edad y el nivel educativo de los encuestados.

Conocimientos

De los encuestados que respondieron el interrogante ¿Qué es el dengue?, el 75,8 % (1.513) consideran el dengue como una enfermedad. De estos 470 (23,5 %) afirman adicionalmente que es un zancudo. El 22,4 % (447) responden que solo es un zancudo. Nueve personas responden que no es una enfermedad y son otras causas diferentes a una enfermedad y un zancudo. Veintidós encuestados (1,1 %) no saben que es el dengue.

En cuanto a los síntomas el 93,3 % reconocieron la fiebre como el síntoma más frecuente, seguido del 80 % de dolor en todo el cuerpo. El 78,6 % reconocieron el dolor de cabeza como un síntoma de la enfermedad. El 64,5 % y el 61,2% no reconocen el brote y el dolor abdominal respectivamente como un síntoma del dengue. La hemorragia fue reconocida en el 52,7 % de los encuestados. El 4,5 % (89) no saben cuáles son los síntomas.

Sobre el mecanismo de transmisión de la enfermedad se observa que el 93,8 % (1.872) saben cómo se transmite el dengue “Picadura de mosquito”. De estos, el 8,3 % (166) responden que también es transmitido debido a un contacto con un enfermo, el 7,5% (141) al contacto con utensilios usados por el enfermo, el 26,9 % (504) a alimentos o agua contaminados, el 1,7% (32) transmitido por otras fuentes diferentes a las señaladas en la encuesta. El 64,5 % sabe que la cadena de transmisión de la enfermedad está ligada a la picadura de un mosquito, sin embargo el 3,2 % identifica otras formas de transmisión que no están asociadas.

Treinta y dos encuestados (1,6 %) no saben cómo se transmite el dengue.

Sobre el lugar de reproducción del zancudo *Aedes aegypti* que transmite el dengue se evidencia que el 71,3 % (1424) de la población encuestada tiene identificado el agua limpia estancada como lugar donde se reproduce el zancudo. El 61,4 % (874/1424) señala las quebradas, ríos y caños. El 48,3 % (688/1424) en basuras. Setenta encuestados (3,5 %) no saben el lugar de reproducción del zancudo.

Al comparar según persona quien responde la encuesta, se observa que los padres de familia tuvieron más frecuencia de respuestas adecuadas que las madres y otro acudiente con relación a que el dengue es una enfermedad (82,4 % [201/244], 75,4 % [1202/1595], y 71,3 % [102/143], respectivamente (Tabla 16).

En cuanto a los signos y síntomas de dengue fueron semejantes las respuestas para fiebre, cefalea y dolor en todo el cuerpo entre los grupos de comparación. Se destaca que síntomas y signos como el dolor abdominal, hemorragias, vómito y brote son conocidos por menos del 67 % de los participantes. Con respecto al modo de transmisión, la frecuencia de respuestas adecuadas según persona quien responde fue de 97,1 % para las madres 93,5 % padres y 91,6 % otro acudiente, según reproducción del mosquito fue de 73,8 %, 71,5 % y 67,8 % respectivamente para los mismos participantes (Tabla 16).

De acuerdo al grupo de edad, los encuestados que tenían entre 48 a 57 años de edad, fueron los que respondieron adecuadamente en cuanto a que el dengue es una enfermedad (81,2 %), además de conocer la mayoría de los síntomas del dengue. Por otro lado el grupo de 38 a 47 años de edad, respondieron adecuadamente sobre el modo de transmisión del dengue reconociendo que es por medio de una picadura de mosquito (95,5 %). Para los mayores de 58 años el zancudo

se reproduce en aguas limpias estancadas, con 88,1 % de frecuencia, comparada con el 63,1 % y 74 % para los otros grupos de edad. Se observó que los grupos que se encuentran en los extremos de la vida (18 y 27 años, y 58 años y más) tenían menos conocimientos que el resto de los grupos de edades (Tabla 17).

Según nivel educativo, se observaron diferencias entre los que tienen algún nivel de educación y los que no tenían ninguno. En los participantes con un nivel educativo superior, se observó en un 81,5 % mejor conocimiento frente a que el dengue es una enfermedad (650/798), en este grupo fueron identificados con mayor frecuencia los signos y síntomas del dengue, tales como fiebre (95,2 %), cefalea (80,2 %) y dolor en todo el cuerpo (82,2 %). Estuvieron de acuerdo en el 95,9 % (765/798) que es transmitida por la picadura de un mosquito, identificando simultáneamente otras causas que no están asociadas a la cadena de transmisión, aun así solo la picadura de un mosquito fue reconocido en el 68,6 % (548/798) de los encuestados como única causa. Las otras formas de transmisión fueron reconocidas en el 4,01 % de los encuestados (32/798). En el 74,1% (591/798) se identificó que el mosquito se reproduce en aguas limpias estancadas (Tabla 18).

Actitudes

El 87,2 % de las personas encuestadas reconocen que él o su familia pueden sufrir dengue. Seguido a esto cuando algún miembro de la familia tiene dengue, el 95,2 % (1.901/1.996) de los encuestados manifiesta que consulta al médico en comparación con el 3,7 % que se auto-medica y el 5,2 % que consulta a la farmacia. El 1,8 % (35/1.996) no sabe qué hacer cuando se presenta este evento. Al comparar quien responde a la pregunta, se observó que los padres, respecto a las madres y otros acudientes responden con mayor frecuencia el adecuado manejo frente a la persona con dengue (97,1 %, 95 % y 95,8 % respectivamente). Fueron semejantes las respuestas por grupos de edad en cuanto a la consulta al médico y a la automedicación. Sin embargo el grupo de edad que más se auto medica es el de 58 años y más con el 7,1 % de frecuencia (3/42). Según el nivel educativo se observó que los encuestados que presentan un alto nivel educativo son los que acuden con mayor frecuencia al médico (97,6 %), cuando sospechan que presentan dengue, comparado con los demás niveles educativos.

Prácticas

El 33,9 % de los encuestados refirió tener platos de mascotas, seguido del 35,6 % que tienen floreros en su vivienda. El 24,8 % y 24,5 % de los encuestados poseen matas sembradas en agua y escurridores de matas respectivamente. El 19,8 % afirma tener tanques con agua sin tapa. Una baja proporción de encuestados tienen inservibles a la intemperie (5,2 %).

Aunque es baja la proporción de individuos con estos utensilios en sus viviendas, las prácticas que las personas emplean para evitar el dengue en su orden descrita fueron: Lavar el tanque del agua (63,7 %), fumigar (56,6 %), drenar las canoas (48,3 %). El 35,2 % de los encuestados tienen como práctica lavar cada 2 o 3 días los floreros, seguido del lavado de los platos de las mascotas con el 34,1%. Veintisiete personas reconocen como otra actividad el evitar la acumulación de aguas estancadas como medida para prevenir el dengue.

Al comparar las practicas frente a la forma de prevenir el dengue respecto a quien responde la encuesta se evidencia que más del 50% de las personas reconocen las acciones preventivas contra el dengue: lavar el tanque, fumigar y drenar las canoas, guardar los inservibles bajo techo, lavar cada 2 o 3 días los floreros y los platos de mascotas (Tabla 14). De acuerdo al grupo de edad se observó que en el grupo de 28 a 37 años la práctica más frecuente fue lavar el tanque de agua (64,9 %) y para los mayores de 58 años fue fumigar (69 %) (Tabla 15).

De acuerdo al nivel educativo se encontró que los encuestados del nivel de educación básica practican con mayor frecuencia el lavado de los tanques de agua (65,8 %), sin embargo el grupo con educación superior practica con mayor frecuencia otras prácticas preventivas frente al dengue, como drenar las canoas (52 %), fumigar (61 %), lavar 2 o 3 veces a la semana los floreros (Tabla 16).

En una alta proporción los acudientes responden que el medio a través del cual han recibido información respecto al dengue ha sido los medios de televisión (89 %), seguido del personal de salud (72,1%), e información reportada en el periódico (61,7 %).

Tabla 16. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación a quien responde.

Conocimientos, actitudes y prácticas	Madre n=1595		Padre n= 244		Otro n=143	
	N°	%	N°	%	N°	%
¿Qué es el dengue?						
Una enfermedad	1202	75,4	201	82,4	102	71,3
Un zancudo	750	47,0	85	34,8	79	55,2
Otro	12	0,8	3	1,2	2	1,4
No sabe	14	0,9	2	0,8	5	3,5
¿Cuáles son los síntomas?						
Fiebre	1491	93,5	222	91,0	137	95,8
Dolor de cabeza	1259	78,9	185	75,8	114	79,7
Dolor en todo el cuerpo	1270	79,6	200	82,0	116	81,1
Brote	590	37,0	66	27,0	51	35,7
Hemorragias	855	53,6	115	47,1	78	54,5
vómitos	959	60,1	138	56,6	97	67,8
Dolor abdominal	611	38,3	97	39,8	61	42,7
Otros	121	7,6	25	10,2	10	7,0
No sabe	73	4,6	8	3,3	7	4,9
¿Cómo se transmite?						
Contacto con un enfermo	154	9,7	25	10,2	14	9,8
Contacto con utensilios usados por el enfermo	119	7,5	21	8,6	15	10,5
Alimentos o agua contaminados	452	28,3	56	23,0	53	37,1
Picadura de mosquito	1492	93,5	237	97,1	131	91,6
Otro	29	1,8	4	1,6	6	4,2
No sabe	29	1,8	3	1,2	0	0,0
¿Cuáles son los lugares en donde se reproduce el zancudo?						
Quebradas/ríos/caños	1063	66,6	168	68,9	96	67,1
Agua limpia estancada	1141	71,5	180	73,8	97	67,8
Basuras	803	50,3	113	46,3	78	54,5
No sabe	58	3,6	6	2,5	6	4,2
¿Qué hace cuando usted o su familia tienen dengue?						
Consulta al médico	1515	95,0	237	97,1	137	95,8
Se auto medica	58	3,6	7	2,9	8	5,6

Se cuida en casa	233	14,6	54	22,1	26	18,2
Consulta a la farmacia	78	4,9	15	6,1	11	7,7
Nada	6	0,4	1	0,4	1	0,7
No sabe	31	1,9	0	0,0	3	2,1
¿Usted o su familia pueden sufrir dengue?	1390	87,1	220	90,2	119	83,2
¿Qué hace para prevenir el dengue?						
Drena las canoas	763	47,8	128	52,5	69	48,3
Lava el tanque de agua	1029	64,5	145	59,4	89	62,2
Fumiga	901	56,5	36	14,8	84	58,7
Guarda los inservibles bajo techo	500	31,3	91	37,3	49	34,3
¿Lava cada 2 o 3 días los siguientes utensilios?						
Escurreedores de matas	453	28,4	70	28,7	35	24,5
Platos de mascotas	548	34,4	91	37,3	37	25,9
Floreros	570	35,7	84	34,4	44	30,8
Ninguna medida	63	3,9	6	2,5	6	4,2
No sabe	28	1,8	4	1,6	4	2,8

Tabla 17. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación al grupo de edad

conocimientos, actitudes y prácticas	18-27 n=130		28-37 n=756		38-47 n=757		48-57 n=223		58 y más n=42	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
¿Qué es el dengue?										
Una enfermedad	89	68,5	544	72,0	608	80,3	181	81,2	32	76,2
Un zancudo	73	56,2	376	49,7	314	41,5	92	41,3	22	52,4
Otro	2	1,5	2	0,3	9	1,2	2	0,9	1	2,4
No sabe	3	2,3	7	0,9	8	1,1	2	0,9	1	2,4
¿Cuáles son los síntomas?										
Fiebre	116	89,2	711	94,0	705	93,1	213	95,5	38	90,5
Dolor de cabeza	83	63,8	590	78,0	611	80,7	181	81,2	40	95,2
Dolor en todo el cuerpo	94	72,3	590	78,0	619	81,8	189	84,8	38	90,5
Brote	46	35,4	277	36,6	260	34,3	88	39,5	14	33,3
Hemorragias	59	45,4	390	51,6	416	55,0	128	57,4	25	59,5
vómitos	74	56,9	458	60,6	451	59,6	143	64,1	32	76,2
Dolor abdominal	41	31,5	293	38,8	291	38,4	103	46,2	17	40,5
Otros	7	5,4	53	7,0	57	7,5	27	12,1	5	11,9
No sabe	11	8,5	31	4,1	35	4,6	4	1,8	3	7,1

¿Cómo se transmite?										
Contacto con un enfermo	12	9,2	74	9,8	70	9,2	28	12,6	3	7,1
Contacto con utensilios usados por el enfermo	10	7,7	55	7,3	65	8,6	20	9,0	2	4,8
Alimentos o agua contaminados	43	33,1	234	31,0	194	25,6	59	26,5	12	28,6
Picadura de mosquito	120	92,3	699	92,5	723	95,5	211	94,6	39	92,9
Otro	2	1,5	9	1,2	17	2,2	7	3,1	2	4,8
No sabe	3	2,3	10	1,3	12	1,6	3	1,3	2	4,8
¿Cuáles son los lugares en donde se reproduce el zancudo?										
Quebradas/ríos/caños	88	67,7	500	66,1	515	68,0	153	68,6	18	42,9
Agua limpia estancada	82	63,1	544	72,0	541	71,5	165	74,0	37	88,1
Basuras	71	54,6	381	50,4	382	50,5	110	49,3	16	38,1
No sabe	6	4,6	24	3,2	26	3,4	5	2,2	2	4,8
¿Qué hace cuando usted o su familia tienen dengue?										
Consulta al médico	123	94,6	714	94,4	724	95,6	216	96,9	41	97,6
Se auto medica	5	3,8	28	3,7	26	3,4	9	4,0	3	7,1
Se cuida en casa	16	12,3	114	15,1	118	15,6	44	19,7	8	19,0
Consulta a la farmacia	8	6,2	40	5,3	39	5,2	11	4,9	2	4,8
Nada	0	0,0	2	0,3	4	0,5	1	0,4	0	0,0
No sabe	3	2,3	13	1,7	12	1,6	3	1,3	2	4,8
¿Usted o su familia pueden sufrir dengue?										
	109	83,8	662	87,6	661	87,3	202	90,6	36	85,7
¿Qué hace para prevenir el dengue?										
Drena las canoas	58	44,6	362	47,9	374	49,4	115	51,6	17	40,5
Lava el tanque de agua	77	59,2	491	64,9	482	63,7	138	61,9	26	61,9
Fumiga	63	48,5	414	54,8	438	57,9	131	58,7	29	69,0
Guarda los inservibles bajo techo	26	20,0	242	32,0	239	31,6	94	42,2	16	38,1
¿Lava cada 2 o 3 días los siguientes utensilios?										
Escurreedores de matas	24	18,5	193	25,5	230	30,4	80	35,9	10	23,8
Platos de mascotas	41	31,5	248	32,8	268	35,4	84	37,7	15	35,7
Floreros	4	3,1	285	37,7	284	37,5	87	39,0	14	33,3
Ninguna medida	5	3,8	29	3,8	31	4,1	6	2,7	0	0,0
No sabe	4	3,1	14	1,9	11	1,5	6	2,7	1	2,4

Tabla 18. Distribución de los conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en acudientes de escolares de instituciones educativas de Medellín en relación al nivel educativo

conocimientos, actitudes y prácticas	Educación básica n=1131		Educación superior n= 798		Ninguno n=24	
	N°	%	N°	%	N°	%
¿Qué es el dengue?						
Una enfermedad	824	72,9	650	81,5	13	54,2
Un zancudo	606	53,6	273	34,2	17	70,8
Otro	7	0,6	9	1,1	1	4,2
No sabe	15	1,3	6	0,8	0	0,0
¿Cuáles son los síntomas?						
Fiebre	1044	92,3	760	95,2	21	87,5
Dolor de cabeza	877	77,5	640	80,2	18	75,0
Dolor en todo el cuerpo	891	78,8	656	82,2	14	58,3
Brote	407	36,0	282	35,3	7	29,2
Hemorragias	597	52,8	421	52,8	13	54,2
vómitos	687	60,7	480	60,2	12	50,0
Dolor abdominal	403	35,6	348	43,6	7	29,2
Otros	83	7,3	66	8,3	7	29,2
No sabe	54	4,8	30	3,8	3	12,5
¿Cómo se transmite?						
Contacto con un enfermo	123	10,9	65	8,1	1	4,2
Contacto con utensilios usados por el enfermo	96	8,5	54	6,8	1	4,2
Alimentos o agua contaminados	337	29,8	201	25,2	12	50,0
Picadura de mosquito	1048	92,7	765	95,9	22	91,7
Otro	18	1,6	20	2,5	1	4,2
No sabe	24	2,1	7	0,9	1	4,2
¿Cuáles son los lugares en donde se reproduce el zancudo?						
Quebradas/ríos/caños	737	65,2	564	70,7	11	45,8
Agua limpia estancada	790	69,8	591	74,1	17	70,8
Basuras	555	49,1	422	52,9	7	29,2
No sabe	50	4,4	19	2,4	1	4,2
¿Qué hace cuando usted o su familia tienen dengue?						
Consulta al médico	1060	93,7	779	97,6	21	87,5
Se auto medica	51	4,5	18	2,3	2	8,3

Se cuida en casa	185	16,4	120	15,0	3	12,5
Consulta a la farmacia	84	7,4	17	2,1	1	4,2
Nada	6	0,5	2	0,3	0	0,0
No sabe	29	2,6	5	0,6	0	0,0
¿Usted o su familia pueden sufrir dengue?	980	86,6	709	88,8	18	75,0
¿Qué hace para prevenir el dengue?						
Drena las canoas	528	46,7	415	52,0	9	37,5
Lava el tanque de agua	744	65,8	488	61,2	13	54,2
Fumiga	611	54,0	487	61,0	9	37,5
Guarda los inservibles bajo techo	362	32,0	266	33,3	6	25,0
¿Lava cada 2 o 3 días los siguientes utensilios?						
Escurreedores de matas	287	25,4	258	32,3	6	25,0
Platos de mascotas	362	32,0	294	36,8	11	45,8
Floreros	355	31,4	326	40,9	8	33,3
Ninguna medida	43	3,8	28	3,5	3	12,5
No sabe	21	1,9	14	1,8	1	4,2

CAPITULO 7

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS DENGUE SEROTIPO 1 AISLADOS DE QUIBDÓ-CHOCÓ Y DE MEDELLÍN Y SU ÁREA METROPOLITANA

Con el objetivo de evaluar la epidemiología molecular y evolución del DENV-1 se realizó el análisis de la secuencia del 1485 nucleótidos del gen de la envoltura (E) de una colección de aislados obtenidos durante 1993-2006 y 2008-2011 provenientes de Medellín y su área metropolitana, en el departamento de Antioquia y algunos aislados de la ciudad de Quibdó en el Chocó, Colombia.

Metodología

Descripción del origen de las secuencias.

Diez y siete secuencias de la envoltura del virus dengue serotipo 1 (DENV-1) provenientes de Antioquia y Chocó fueron evaluadas. Diez de los virus se obtuvieron de sueros de casos probables de dengue como parte de la vigilancia rutinaria del Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia (LDSP) durante el periodo 1993-2006 (135). Tres aislados correspondían a los obtenidos de los síndromes febriles en escolares previamente descritos y cuatro aislados fueron obtenidos de pacientes con síndrome febril de la ciudad de Quibdó durante un estudio descriptivo de corte transversal en pacientes con síndrome febril entre el 2008 y el 2010 (136).

Técnicas moleculares

El ARN viral (ARNv) fue extraído del sobrenadante del cultivo celular (o directamente del suero) usando el estuche QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNv fue copiado a su ADN complementario mediante transcripción reversa usando el kit Superscript III First Strand cDNA Synthesis kit – Invitrogen, posteriormente fueron amplificados por PCR convencional, usando la enzima Q5 High Fidelity DNA Polymerase – New England Biolabs dos fragmentos que se superponen y que incluían el gen completo de la envoltura del DENV-1, estos dos fragmentos comprendían la región 5'UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B; posteriormente, se realizó la purificación de los productos de PCR y utilizando 8 cebadores internos (Anexo 4) (137) que hibridaban en diferentes partes de los fragmentos amplificados, fueron utilizados en reacciones individuales para ser enviados a la unidad de secuenciación del centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison en Estados Unidos y así obtener la secuencia del gen de la envoltura de las diferentes muestras evaluadas.

Alineamiento y secuencias

Los cromatogramas obtenidos para cada uno de los aislados fueron ensamblados en el programa Seqman del paquete DNASTar (Lasrgene, Madison WI). Para el alineamiento se incluyeron secuencias del gen de la envoltura de diferentes partes del mundo representativas de todos los genotipos descritos de DENV-1 obtenidas de la base de datos del Genbank. Éstas fueron seleccionadas tratando de maximizar la representación en tiempo y espacio. Diez secuencias disponibles de otras regiones de Colombia, principalmente Santander, también fueron incluidas. En total 105 secuencias del gen de la envoltura del DENV-1 fueron incluidas en el análisis.

El alineamiento por codones se llevó a cabo usando el algoritmo MUSCLE implementado en el programa MEGA v6.06. Las secuencias fueron alineadas y ajustadas a la longitud del gen de la envoltura (1485 nucleótidos); con excepción de la muestra 514LAS_Quibdo (1.296 nt) y las secuencias de China 11801 y 12375 (1.479nt). La información de las secuencias seleccionadas en el análisis se presenta en la Tabla 19 (Anexo 5).

Análisis Filogenético

El modelo de sustitución nucleotídica: “general con tiempo reversible” con distribución gamma (GTR+G) fue seleccionado como el más apropiado con base en el criterio de información corregido de Akaike (AICc), implementado en MEGA. El análisis filogenético se realizó en el programa MrBayes v3.2.2. Realizando dos corridas de cuatro cadenas Markovianas de Monte Carlo (MCMC) cada una. Durante un millón de generaciones, con una frecuencia de muestreo en las cadenas de una cada 1000 generaciones, lo que permitió alcanzar una convergencias adecuada, verificada por una desviación estándar de las frecuencias de los “Split” <0.01. Adicionalmente, para verificar que se había logrado la distribución de probabilidades estacionaria en las MCMC, y que el muestreo de las MCMC alcanzó un tamaño de muestra efectivo (ESS) >200 se usó el programa Tracer v1.5. El árbol consenso por mayoría fue generado excluyendo (“burnin”) el 20% inicial de cada corrida, posteriormente fue editado y visualizado usando el programa FigTree v1.4.2.

Se realizó un análisis de selección basado en la razón de las tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas (dN/Ds) usando el método modificado de Nei-Gijobori en MEGA en las secuencias de origen colombiano.

Resultados

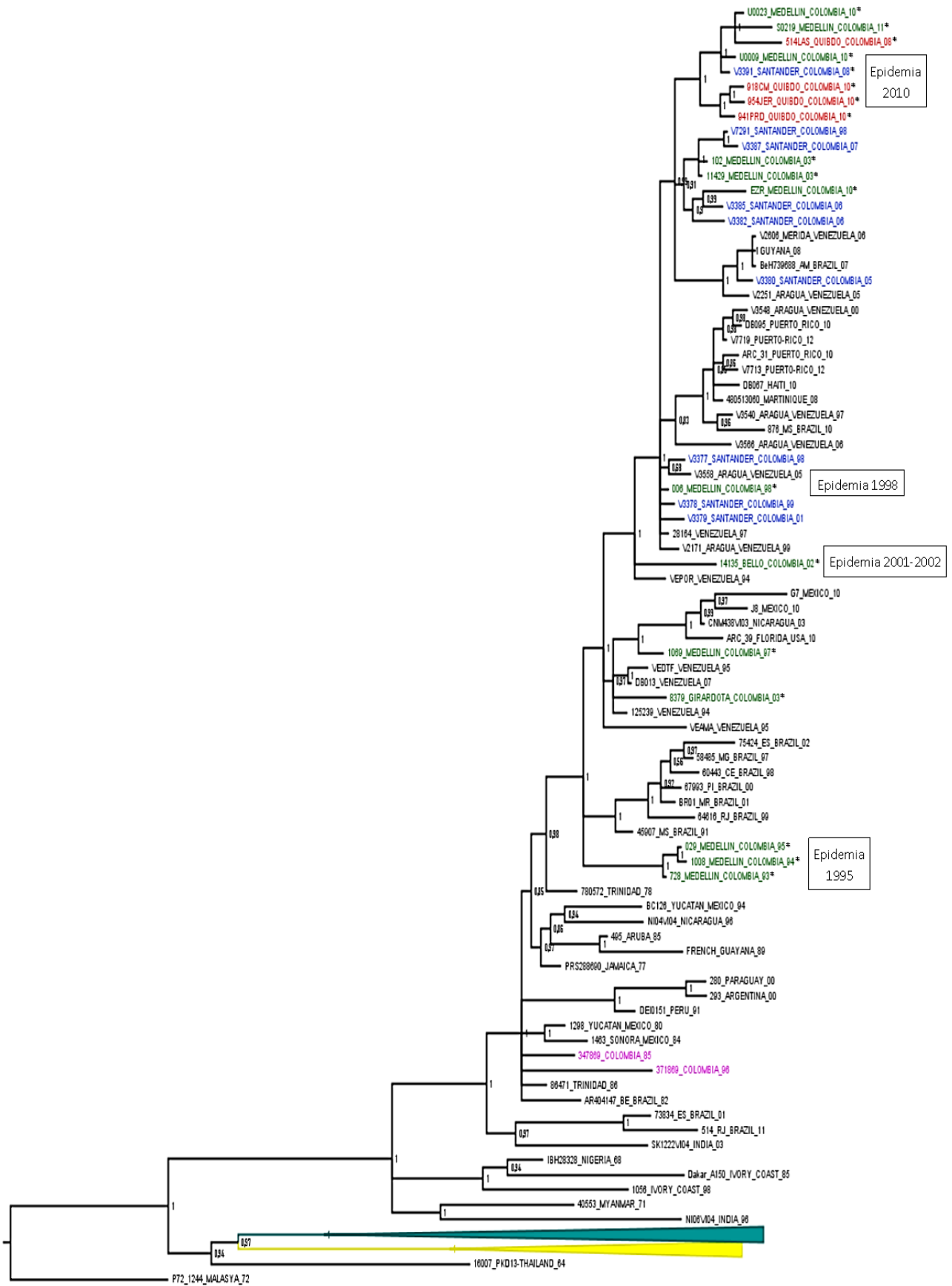
Las 105 secuencias del gen de la envoltura del DENV-1 (1485 nt) incluidas en el análisis Bayesiano confirman la presencia de cinco grandes grupos filogenéticos, correspondientes con los 5 genotipos previamente reportados en la literatura para DENV-1 (genotipos I—V). En árbol fue enraizado usando como “outgroup” la secuencia del virus DENV-1 P72-1244 de origen selvático aislado en Malasia en 1972 y única representante del genotipo III (Figura 7).

Todas las secuencias de los aislados de Las Américas se agrupan en el genotipo V en el que también están secuencias asiáticas (Myanmar, India) y africanas (Costa de Marfil, Nigeria). Las secuencias americanas forman un grupo parafilético dentro del genotipo V con un alto soporte (probabilidad posterior=1,0). Este grupo incluye una secuencia de la India de 2003; todas las demás secuencias fueron obtenidas de cepas aisladas entre 1977 y 2012.

Los diferentes aislados colombianos se presentan polifiléticamente dentro del genotipo V, sugiriendo múltiples entradas del virus al país (Figura 7). Los aislados de Chocó de 2008 y 2010 se agrupan con un alto soporte en un linaje que también contiene secuencias de Santander (2008) y de Medellín (2010-2011). Los aislados de Antioquia y de Santander aparecen dispersos en el árbol e intercalados con cepas del Suramérica (Venezuela, Brasil), Centroamérica (Nicaragua) y Norteamérica (México y Estados Unidos), indicando un frecuente tráfico de cepas entre países.

Algunos linajes corresponden a cepas aisladas en ciertos intervalos de tiempo definidos (1993-1995, 1997-2007, 2008-2011) comprenden algunos períodos epidémicos que han ocurrido en Colombia y en las que el virus DENV-1 ha estado implicado como las de 1995, 2001-2002 y 2009-2010 (1). Sin embargo no se observa una estricta estructuración temporal ni geográfica de los linajes.

Adicionalmente, el análisis de selección basado en la razón de las tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas (Dn/Ds), usando las 28 secuencias colombianas indicó que no hay evidencia de presión positiva en alguno de los 495 codones del gen de la envoltura y que 133 codones muestran evidencia de selección purificadora.



0.009

Figura 7. Árbol consenso por mayoría producto del análisis bayesiano del gen de la envoltura (1485 nucleótidos) de DENV-1. Los virus de los genotipos I y IV, constituidos por secuencias del Pacífico, Sur y Sureste asiáticos se muestran colapsados. Los genotipos II y III están representados por una sola secuencia (Tailandia 64 y Malasia 72, respectivamente). El resto corresponde al genotipo V. El valor de la probabilidad posterior de cada clado se muestra cerca del nodo correspondiente. Los virus provenientes de Santander se muestran en azul, los de Antioquia en verde, los de Chocó en rojo; otras secuencias colombianas de origen no precisado están en fucsia. Las secuencias obtenidas en este estudio están indicadas con un asterisco. El año de las epidemias de dengue es indicado al final de la rama del correspondiente aislado del mismo año. El análisis se realizó con MrBayes v3.2.2 y el árbol fue editado con FigTree v1.4.0

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio permitieron confirmar, lo que otros autores han reportado acerca del subregistro de casos de dengue en poblaciones endémicas, donde la incidencia reportada a nivel nacional es mucho menor a la que se encuentra cuando se realizan estudios de cohorte o vigilancia activa en la misma región (19,22,138). El estudio longitudinal de cohorte en escolares permitió determinar que la infección por dengue fue una causa importante de los síndromes febriles en la población escolar. La incidencia de dengue en esta cohorte de escolares con síndrome febril en el 2010 fue de 15,4 % [IC95%= 10,5—21,9] y en el 2011 de 10,4 % [IC95%= 5,0—19,2]. Comparando los datos de incidencia del presente estudio con otros estudios realizados en escolares en otros lugares del mundo, se observa que son variables de acuerdo al país y al año de evaluación: En Nicaragua, la incidencia de dengue fue 12% y 6% en dos años de seguimiento (69). En Venezuela, la incidencia acumulada de dengue fue 25,8% (22). En Tailandia hay reportes de incidencia de dengue de 5,8% (20) y del 3,4% (21) y en Vietnam fue observada una incidencia de dengue de 11,7% (139). Nuestros resultados son semejantes a los de Nicaragua, Vietnam y Tailandia, pero inferiores a los encontrados en Venezuela.

Adicionalmente en comparación con estudios de cohorte similares, con búsqueda activa de síndromes febriles, un recientemente artículo publicado (140) realizado en individuos entre 9-16 años en cuatro países de América Latina: Brasil, Puerto Rico, México y Colombia, encontraron una densidad de incidencia de dengue en síndromes febriles de 4,1 x 100 personas-año [IC95%= 3,2—5,4]. Este estudio fue realizado entre junio del 2010 y Octubre del 2011, las ciudades participantes fueron Yopal, Aguazul, Acacias, Girardot, La Tebaida, Montenegro, Calarcá y Armenia, La densidad de incidencia reportada para Colombia fue de 1,9 x 100 personas-año [IC95%=1,1—3,4]. La edad promedio en años de los casos fue 12,4 ±2. En el presente estudio la edad promedio de los casos de dengue fue 11,1±3,3. Un estudio de cohorte prospectivo realizado en el Área Metropolitana de Bucaramanga durante el 2004 encuentra que la población más afectada son individuos menores de 15 años (141). Un estudio epidemiológico sobre las características del dengue pediátrico en Panamá durante los años 2000 y 2005 en menores de 18 años, reportan que la mediana de casos de dengue fue de 13 años (142). En conjunto estos resultados confirman al grupo de edad escolar como el más afectado por la infección por dengue. Adicionalmente, revisiones sistemáticas de la literatura (143) y de la dinámica de la epidemia de dengue en Colombia en los años 2000 y 2011, también sugieren que entre el 2004 y 2010 los grupos de mayor incidencia del dengue fueron los menores de 15 años (143).

Se encontró que la presentación clínica de la enfermedad fue predominantemente indiferenciada. Estos hallazgos no coinciden con lo reportado en la literatura, que relaciona la circulación simultánea de los cuatro serotipos con aumento de la severidad de la enfermedad (20,72). En estos estudios se demostró que la incidencia de años previos tiene influencia en años posteriores. Años de elevada incidencia son seguidos por años de casos clínicamente inaparentes. En el presente estudio el 75,6% (31/41) de los casos agudos de dengue fueron diagnósticos durante la epidemia del año 2010.

Además se ha documentado que entre 2000 y 2010 en nuestro país el reporte anual de casos severos o de dengue hemorrágico estuvo en aumento, igualmente se observó un aumento en mortalidad por dengue durante la epidemia del 2010 (143). Adicionalmente, el 90,3% de los casos eran infecciones secundarias, estos hallazgos fue principalmente corroborado con los resultados de las muestras evaluados por MNT-50, se encontró que la respuesta inmune de los escolares era principalmente secundaria heterotípica y con altos títulos de anticuerpos contra los cuatro serotipos del virus, aunque la infección secundaria es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad severa, todos los casos de dengue encontrados en el presente estudio fueron no severos (78,119). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Ocaiones y col en Santander, en donde 15 pacientes con síndrome febril fueron evaluados por PRNT, en ellos encuentran un respuesta secundaria heterotípica, los autores postulan que los pacientes con menor título de anticuerpos tienen más probabilidad de desarrollar las formas severas, concluyendo que posiblemente la magnitud de la respuesta de anticuerpos podría ser un factor determinante en la severidad del dengue. Sin embargo, también concluyen que una infección secundaria por DENV2 con una previa infección con DENV1 aumenta el riesgo de la presentación del dengue severo o hemorrágico, lo cual ha sido documentado en otros estudios (69,145).

Con relación a la caracterización de los signos y síntomas del dengue en ésta población escolar, se pudo observar que su presentación clínica en el inicio es semejantes a los de otros síndromes febriles, en el presente estudio la frecuencia de las mialgias, artralgias, lumbalgia, brote y la presencia de petequias fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los casos de infección aguda por dengue en comparación con el grupo de otros síndromes febriles, mientras que en éste grupo de OSF las petequias en mucosa, las adenopatías cervicales y la frecuencia respiratoria aumentada fueron significativamente más frecuentes ($p < 0,05$).

Durante la fase convaleciente se observó un aumento significativo en la frecuencia de diarrea ($p = 0,001$), también un aumento de parestesias, vómito, otalgia, dolor de garganta, dificultad respiratoria, hemorragia gingival y nasal en el grupo de casos de infección por dengue mientras que en el grupo de OSF se aumentó la frecuencia de mialgias, artralgias, parestesia, dolor de cuello, brote y hemorragia gingival.

Estos resultados son similares a los resultados obtenidos en un estudio de indicadores tempranos de infección por dengue en niños de 5 a 12 años en la ciudad de Bucaramanga (146), en donde

encuentran que la enfermedad por dengue cursa como un síndrome febril inespecífico que se caracterizó en ese grupo de pacientes por la presencia de eritema fácil ($p < 0,05$), leucopenia, dolor abdominal y ausencia de rinorrea. Otro estudio realizado en la misma ciudad evidencia la dificultad del diagnóstico temprano del dengue en áreas endémicas, en ese estudio encuentran el predominio de la presentación clínica inespecífica y la población más afectada los menores 15 años, las manifestaciones clínicas más frecuentes pero con diferencias no significativas comparadas con otros síndromes febriles fueron dolor retroocular, exantema, náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea, mareo y metrorragia (141). En todos se concluye que el grupo de edad más afectado son los escolares.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con un estudio previo realizado por Restrepo y col que evidencia el predominio de la presentación clínica no severa del dengue en pacientes atendidos de manera ambulatoria u hospitalizados de la ciudad de Medellín con una mediana de edad de 5 años (rango de 1 a 63) (147). Adicionalmente, Endy y col. Describe que uno de los factores del sub-registro de los casos de dengue es la sintomatología inespecífica y leve de los casos (148).

Cuando se realizó la comparación entre los grupos de edad escolar (6-12 años) y adolescente (13 a 18 años) se encontró que en el grupo de adolescentes son más frecuentes los síntomas clásicamente relacionados con la infección por dengue como artralgias, petequias y prueba del torniquete positiva ($p < 0,05$) comparado con el grupo de escolares en donde fueron más frecuentes los síntomas respiratorios, el eritema en garganta, la conjuntivitis, la diarrea y la hemorragia nasal. Estos hallazgos concuerdan con los reportados en un estudio en Panamá donde se encuentran diferencias en la presentación clínica del dengue entre los grupos de edad, siendo por ejemplo la tos más común en niños menores de 5 años, mientras que epistaxis y dolor retroocular en el grupo de edad de 6 a 10 años, mientras que las mialgias, artralgias, náuseas, cefalea y escalofríos fueron más frecuentes en los mayores de 11 años. Concluyendo que en los niños pequeños la sintomatología del dengue es inespecífica.

En el presente estudio se encontró que la infección secundaria representó el 90,3% de los casos de dengue, cuando se comparan la frecuencia de los signos y síntomas con los casos de infección primaria, se encuentra que las manifestaciones hemorrágicas, la prueba del torniquete positiva, el brote, el dolor retroocular, las mialgias, artralgias y la lumbalgia, parestesias, cefalea, vómito y diarrea son más frecuentes que en la infección primaria, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al bajo número de casos a comparar con las infecciones primarias.

En contraste con estos resultados de enfermedad no severa en escolares atendido ambulatoriamente, un estudio en Bucaramanga durante los años 1992-2000 en niños hospitalizados menores de 13 años: 0,3% recién nacidos; 11,8% lactantes, 23% pre-escolares y 64,9% escolares. Reportan una frecuencia del 80,9% de casos clasificados como dengue

hemorrágico, las manifestaciones clínicas presente en el 100% de los casos son la fiebre y las manifestaciones hemorrágicas, adicionalmente también fueron frecuentes en menor proporción el vómito, el dolor abdominal, la cefalea, dolor osteomuscular, la hepatomegalia y el derrame seroso. En este grupo de pacientes la mortalidad fue del 1,5% (149). Otro reporte encontró una mayor la frecuencia del dengue severo o hemorrágico (49,3 %) en la población escolar (6 a 12 años) con presentación de manifestaciones hepáticas y neurológicas inusuales (150). Otro estudio retrospectivo realizado en la ciudad de Neiva durante un año epidémico (2004) en niños menores de 13 años, encuentra que los casos de dengue se encuentran en el 67% en niños menores de 5 años, el 21% en niños de 5 a 10 años y el 12,4% en mayores de 10 años. El 87,6% fue diagnosticados con dengue hemorrágico y el 12,4% con fiebre del dengue. El 75% de estos pacientes presentaron hemorragias de piel y mucosas diferentes al tracto digestivo, el 81,9% presentó hepatomegalia, 20% presentó choque y de estos el 76% presentó algún tipo de complicación.

Adicionalmente, los resultados del presente estudio son evidencia de que en la ciudad de Medellín la epidemia estaría pasando por un desplazamiento o aumento de la incidencia de dengue a población infantil en edad escolar. Éste fenómeno ha sido descrito reciente en el país durante la epidemia del 2010 (1). Evidentemente, más estudios con poblaciones que representen todos los grupos etarios de la ciudad de Medellín y con un enfoque metodológico que permitan confirmar esos hallazgos son necesarios para confirmar los resultados encontrados en el presente trabajo.

En el estudio longitudinal de monitoreo serológico se encontró una frecuencia de anticuerpos IgM del 3,0%, 0,4% y 3,2% para los años 2010, 2011 y 2012. Si se extrapolan estos resultados indicarían una incidencia acumulada de 2.993x100.000 hab para el 2010; 408x 100.00hab en el 2011 y 3.183x 100.000hab en el 2012. En comparación con los datos reportados por la secretaria de salud en la población de 5 a 19 años la incidencia acumulada para los correspondientes años sería de 974 x 100.000 hab (1); 35,9 x 100.000 hab y 772x 100.00 hab respectivamente. Aunque estos resultados deben ser vistos con precaución ya que se realizó una sola medición de anticuerpos IgM en cada año y estos anticuerpos permanecen solo hasta por tres meses en el individuo, sin embargo son evidencia de que la circulación del dengue en la ciudad es aún mayor a la reportada.

Se observó en este estudio un aumento de escolares (grupo de edad 10-14 años) con presencia de anticuerpos IgM y asintomáticos, la relación asintomático/sintomático oscilo entre 1:1 en 2010 el año de mayor epidemia a 11:0 en 2011 y 26:1 en 2012. Estos resultados también deben ser interpretados con precaución ya que los datos se determinaron al indagar al acudiente y/o escolares si habían presentado fiebre en los últimos 3 meses, sin embargo estos hallazgos están

de acuerdo con otros autores (19–21). Las diferencias encontradas en la incidencia de casos asintomáticos y sintomáticos podrían ser explicadas por el año en que fueron evaluados los pacientes, el diseño y lugar del estudio, la respuesta del individuo, el serotipo circulante (19,20). Adicionalmente se encontró que las mujeres presentaron una mayor frecuencia de anticuerpos en todos los años, el grupo de edad de 15 a 19 años, presentó la mayor frecuencia en los dos primeros años y el grupo de 5 a 9 años en el año 2012.

Los resultados de la frecuencia anticuerpos IgG son bastante interesantes, a pesar de las limitaciones de la Elisa casera que se desarrolló en nuestro laboratorio, es importantes resaltar los resultados encontrados, además de valorar el tamaño de muestra evaluada (>3.000 individuos). Los problemas de sensibilidad y especificidad cuando se compara con una prueba de oro tan sensible y específica como son los ensayos de microneutralización en placa, fueron inclusive evidenciados en las pruebas diagnósticas comerciales, estos hallazgos son discutidos en capítulo 2 en el artículo de pruebas diagnósticas.

Los principales hallazgos fueron la alta frecuencia de escolares con anticuerpos IgG, se encontró un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de anticuerpos IgG en cada año del estudio, para el 2010 fue del 54,6%, en el 2011 del 59,3% y en el 64,7% en el 2012 ($p < 0,05$). Se encontraron diferencias en cuanto al género, siendo las mujeres las más afectada por el dengue. En cuanto a la raza se observó un aumento significativo en la frecuencia de estos anticuerpos en los mestizos, aunque la población afrodescendiente también presentó una alta frecuencia de anticuerpos IgG.

Otros de los hallazgos interesantes del presente estudio fue la tendencia significativa entre la frecuencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue y el estrato socioeconómico. El riesgo de exposición al virus del dengue en la población estudiada fue mayor en los que viven en los estrato socioeconómicos bajo, aunque también se observó el aumento de la frecuencia de estos anticuerpos en la clase media en los 3 años del estudio.

Adicionalmente, se observó una tendencia significativa al aumento entre edad y la frecuencia de anticuerpos IgG, la cual iba desde 35,9% en niños de 5 años en el 2010 hasta el 100% en escolares de 18 años en el 2012. En concordancia con los resultados previamente expuestos el grupo de edad más afectado entre el 2010-2011 fue el de 15 a 19 años y en el 2012 fue el grupo de 10-14 años. Se observó también que la mediana de edad de los escolares que sufrieron la seroconversión de anticuerpos IgG fue de $10,3 \pm 3$, el porcentaje de seroconversión fue mayor entre 2010-2011 (16,5%) comparado con el periodo 2011-2012 donde la seroconversión disminuyó al 10,4%.

Cuando se realizó la caracterización de la respuesta inmune de estos anticuerpos por MNT-50 en 357 escolares se encontró una frecuencia de anticuerpos IgG de 96,9%, en los individuos positivos esta respuesta se caracterizó por un alto título de anticuerpos con respuesta heterotípica. En el 2010 y 2012 la mediana de los títulos de DENV4 era mayor que en los otros serotipos, entre el 2010 y 2011 se observó un aumento en la mediana de los títulos de anticuerpos contra el DENV1 y una disminución para los títulos contra DENV2. Al contrastar estos resultados con otros trabajos de la región, en países como Perú, Salvador y Brasil la prevalencia oscila entre el 66-83% mientras que en Nicaragua la seroprevalencia de dengue en escolares ha sido del 91% (19). Similar a nuestros hallazgos, la prevalencia del dengue aumentaba con la edad, en los niños de cuatro años fue del 75% y llegaba al 100% a los 16 años. En escolares de Vietnam, la prevalencia reportada en el 2005 fue del 65,7%. (23). Similar a los resultados encontrados en el presente estudio

El estudio de cohorte realizado en cuatro países de América latina incluida Colombia y del que se habló previamente reporto una prevalencia general en los niños de 9-16 años del 70,9%, siendo en Colombia donde se observó una mayor prevalencia al finalizar el estudio de 91,8,% (IC95% 90,0-93,3%) (140). En cuantos a las características sociodemográficas se encontró el riesgo de infección por dengue es mayor en la mujeres, es un hallazgo que concuerda con la mayoría de estudios realizado en el país y que se ha observado en países de America Latina, como México, sin embargo difiere en países asiáticos donde los reportes indican que los hombres tienen 2 veces mayor el riesgo de contraer dengue que las mujeres (119). Este hallazgo es importante porque la transmisión de anticuerpos IgG durante la gestación está asociada a infección severa en el niño menor de 1 año. En el presente estudio la seroprevalencia del dengue fue mayor en el sexo femenino (futuras madres).

se ha reportado que las condiciones socioeconómicas afectan la transmisión del virus, factores como la urbanización no planificada, el acceso o almacenamientos inadecuado de aguas, podrían estar afectando la incidencia y prevalencia del dengue siendo mayor en las regiones o personas más pobres (119). En concordancia con esos reportes en el presente estudio el estrato socioeconómico bajo presentaban una mayor frecuencia de anticuerpos IgG e IgM.

El comportamiento epidemiológico observado está de acuerdo con el comportamiento entomológico en el cual el 28,7% de las viviendas de los estudiantes tenían presencia de criaderos y los índices de infestación para larvas de *Aedes Aegypti* y para la presencia de adultos fueron elevados, 13,8% y el 20,2% respectivamente, igual situación se observó en las IE, por lo tanto el riesgo de transmisión de dengue es tanto en el hogar como en la escuela. También se pudo determinar que no hay correlación entre la clasificación de riesgo de la de los índices entomológicos de la OMS con la transmisión del dengue, zonas consideradas de riesgo bajo por los índices de infestación presentaron casos.

La evaluación del nivel de conocimientos, actitudes y prácticas relacionadas con el dengue en acudientes de escolares evidencio que el 70 % de los encuestados identificaron adecuadamente el dengue como una enfermedad y reconocieron sus principales signos y síntomas como lo son la fiebre, cefalea y dolor en todo el cuerpo. Los hallazgos descritos tienen un comportamiento superior al reportado por Shuaib F y cols en Jamaica, en donde el nivel de conocimiento sobre estos signos y síntomas se ubican por debajo del 50 % de la población encuestada (151).

Con relación al conocimiento que tiene el encuestado sobre cómo se transmite el dengue, el 93,8% de los encuestados reconocen que es una enfermedad transmitida por la picadura de un mosquito, aun así identifican otras formas no asociadas a la cadena de transmisión. Este hallazgo demuestra un conocimiento poco adecuado sobre la cadena de transmisión del dengue. El 64,2% reconoce debidamente que es a través de la picadura de un mosquito, comportamiento superior a otros estudios realizados en Brasil y Paraguay donde el 30 % y 24,6 % respectivamente identifica adecuadamente la transmisión del dengue (152,153).

Con relación al lugar de reproducción del mosquito el 71,3 % de los encuestados identifica el agua limpia estancada como lugar donde se reproduce el zancudo. En el estudio de Gonzales y cols, 2011, el 35% de la población encuestada identifica este lugar de reproducción del mosquito (154). Se observaron diferencias entre los que tienen algún nivel de educación y los que no tenían ninguno. En los participantes con un nivel educativo superior, se observó un mejor conocimiento frente a que el dengue es una enfermedad (81,5%) transmitida por la picadura de un mosquito (95,9%) y que este se reproduce en aguas limpias estancadas (74,1%) (151) Shuaib F y cols observó que el nivel educativo se asoció positivamente con el nivel de conocimiento en cuanto al modo de transmisión de la enfermedad (151). Sin embargo, es preocupante que aproximadamente el 30% de la población afirmen que el dengue tiene otros modos de transmisión como contacto con un enfermo, contacto con utensilios usados por el enfermo, con alimentos o aguas contaminadas. Otras formas de transmisión fueron identificadas en el 1,7 % de los encuestados. Estos hallazgos ponen en consideración la necesidad de crear nuevas estrategias de promoción y prevención de la enfermedad en los establecimientos educativos (151). A pesar de que un número elevado de encuestados identifican que el modo de transmisión del dengue es vectorial y que los mosquitos se reproducen en aguas limpias estancadas, los porcentajes que practican medidas de prevención del dengue no son elevados, sin embargo son superiores a los reportados por otros autores que han encontrado que aproximadamente el 30% practican medidas de prevención. (151).

De otro lado frente a la actitudes de los acudientes en caso de enfermar por dengue, se observó que más del 90% la población encuestada refirió que consultan al médico, sin embargo menos del 7% consultaban en la farmacia y se auto-medicaban. Este hallazgo está acorde a lo encontrado por Cáceres-Manrique y cols en Bucaramanga, Colombia quienes describen que la mayoría de las personas consultan al médico, mientras que una de cada 8 personas se auto-medica y entre 3 y 4 % consultan a la farmacia. Es de gran importancia que las personas empleen esta acción en cuanto

al que hacer respecto a si él o su familia tiene dengue porque da la oportunidad de tener un manejo adecuado del dengue y la correspondiente notificación del caso, seguimiento y orientación de medidas ambientales para evitar la transmisión a otras personas (155).

Los acudientes encuestados demuestran un adecuado conocimiento sobre las medidas preventivas y control del dengue, las prácticas más referidas para evitar el dengue fue Lavar el tanque del agua (63,7 %), fumigar (56,6 %), drenar las canoas (48,3 %), siendo inferior a los hallazgos encontrados por otros autores cuya práctica se encuentra por encima del 80 % (156).

El evitar la acumulación de agua limpia estancada fue otra actividad puesta en mención por el 1,5 % de los encuestados.

Considerando que el 89% de los encuestados afirmó que la principal fuente de información acerca del dengue fue los medios de televisión, seguido del personal de salud (72,1 %) puede plantearse la posibilidad de que en la campaña dirigida por estos medios es posible la difusión del conocimiento y la información que poseen las personas frente a este evento de importancia en la salud pública, como lo presentado durante la epidemia del 2010.

En conclusión los resultados sugieren que los acudientes de las tres instituciones educativas de Medellín, poseen un adecuado nivel de conocimiento sobre la enfermedad y que está acorde con las actitudes y prácticas dirigidas a reducir su incidencia. Se observó una alta proporción de encuestados con actitudes positivas frente al manejo de la enfermedad, sin embargo, una baja proporción se dedicaba a prácticas preventivas positivas. Por tanto las prácticas no son óptimas en cuanto a lo referente a la prevención de la misma, por lo que es importante incentivar acciones que motiven a las personas a mejorar sus conocimientos y llevarlos a la práctica. Además se requiere mejorar la participación de las Instituciones Educativas para poder intervenir en la prevención y control del dengue. En ésta enfermedad la participación comunitaria es clave porque se requiere que la población esté informada para poder disminuir el impacto que tiene esta enfermedad en la salud pública.

En cuanto a la caracterización virológica de los casos de infección aguda por dengue, se determinó la circulación de los serotipos DENV1 y DENV3 en el 2010 y de los serotipos DENV1, DENV2 en el año 2011. Según la información disponible en el Laboratorio Departamental de Salud Pública de la Dirección Seccional de Salud de Antioquia, los 4 serotipos de dengue circularon en el 2010 y en el 2011 los serotipos DENV-1, DENV-3 y DENV-4.

Debido a la baja representatividad de serotipos detectados por RT-PCR y/o aislamiento viral (3,7% de las muestras evaluadas fueron positivas) en este estudio no fue posible hacer inferencia sobre la relación del serotipo circulante y la presentación clínica de la enfermedad.

EL análisis filogenético de los aislados del DENV-1 obtenidos en este estudio permitieron confirmar la presencia del genotipo V, como único genotipo circulante en Medellín y su Área

Metropolitana y en los aislado provenientes del Chocó. En los últimos años se encontró además múltiples eventos cladogénicos produciendo la circulación de múltiples linajes que coincidieron en algunos casos con epidemias de dengue en Colombia, donde el serotipo DENV1 ha sido aislado como las de los años 1995, 1998, 2001-2002 y 2009-2010.(1). Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en el país donde también describen la circulación del genotipo V y su diversificación en múltiples linajes temporalmente definidos (40)(43), Sin embargo difieren con el Trabajo de Mendez y col en cuanto a que en nuestro estudio no encontramos evidencia de circulación del genotipo I.

El análisis de selección (*Dn/Ds*) de las secuencias de Colombia (28 secuencias) no evidencia presión positiva en alguno de los 495 codones del gen de la envoltura pero si 133 codones muestran evidencia de selección purificadora. Estos hallazgos coinciden con estudios realizados en otros países endémicos como Malaysia, Teoh y col sugieren que el reemplazo de linajes es probablemente un evento estocástico en la evolución del gen de la envoltura del DENV-1 ya que se evidencia un proceso de selección purificadora, posiblemente debido al efecto cuello botella, propio de los virus con genoma ARN (144).

Este estudio fue el primero en realizarse en Colombia con la metodología de seguimiento de cohortes y monitoreo serológico en escolares, una población que se puede considerar “centinela” de lo que puede estar pasando en su comunidad. Los resultados obtenidos evidencian que la vigilancia activa de dengue a través de síndromes febriles y el monitoreo serológico en forma periódica es una estrategia que permite:

- 1) La detección temprana de brotes y de los serotipos circulantes, porque se pudieron detectar casos leves y asintomáticos. Esta información puede ser utilizada para la aplicación de los programas de control antes de que la epidemia sea incontrolable o muy costosa su intervención y para adecuar la atención de los pacientes en los servicios de salud.
- 2) Conocer la dinámica del dengue en la población, en cuanto a la frecuencia de la enfermedad, el espectro clínico, la presencia de infecciones asintomáticas y la epidemiología de los casos recientes. Nuestros resultados son un aporte al conocimiento de la historia natural de la “infección” por el virus del dengue en la comunidad de Medellín. Que permite no solo conocer los casos de dengue que acuden a los servicios de salud, permitiendo dar una visión más global del problema del dengue.
- 3) Evaluar el riesgo de exposición anterior al virus del dengue en la población de estudio y los factores socio-demográficos involucrados puedan contribuir a la implementación de estrategias preventiva adecuadas para el control y manejo de los casos.

- 4) La identificación de las zonas de riesgo y la dispersión de los casos como una fuente de información para aplicación de las medidas de control a través de la aplicación de los índices entomológicos y del sistema de información geográfica

Gubler y col, discute que el éxito de los programas de control dependerán de una mejor vigilancia y propone un enfoque de vigilancia activa con énfasis en períodos inter-epidémicos de dengue a través de alerta temprana que pueda predecir la epidemia.(157)

Es importante tener en cuenta las siguientes limitaciones del estudio para interpretación de los resultados encontrados: 1) El cambio de escuela de los escolares por desplazamiento intra-urbano. 2) el número de visitas domiciliarias fueron restringidas. Ambas situaciones por problemas de seguridad. 3) La aceptabilidad para participar en el proyecto en las IE privadas fue menor. 4) En los periodos vacaciones no fue posible realizar la vigilancia de síndromes febriles.5) A nivel de laboratorio la baja sensibilidad y especificidad encontrada en diferentes pruebas diagnóstica utilizadas podrían dar una sub-estimación de los casos.

Se espera que los resultados presentados en el presente este estudio, puedan contribuir a diseñar estrategias preventivas adecuadas y adaptadas a la ciudad de Medellín.

EQUIPO DE TRABAJO

Investigadores

Berta Nelly Restrepo MD MSc

Jorge Emilio Osorio MDV, PhD

Mark Betty MD, PhD

Gabriel Parra Biol, PhD

Sair Orieta Arboleda Sanchez, Biol, MSc, PhD

Trabajo de Campo y laboratorio

Juliana Duque. MD

Marcela Escobar. MD

Lina Restrepo. MD

Angela Maria Trujillo Restrepo. MD

Maria Guadalupe Argel. Aux. Enfermeria

Isabel Espinosa. Aux. Enfermeria

Ruth Ramirez , Bacterióloga

Ivony Agudelo , Bacterióloga

Celeny Ortiz, Biol.

Tomás Vallejo, Biol.

Erika Alarcón, Biól. MSc

Estudiantes rotantes del pregrado de Bacteriología del Colegio Mayor de Antioquia

ENTIDADES FINANCIADORAS

Colciencias: Código 325649326211

Inviragen, Inc /Takeda Pharmaceutical Company Limited

ENTIDADES PARTICIPANTES

Pediatric Dengue Vaccine Initiative (PDVI)/ Dengue Vaccine Initiative (DVI)

Laboratorio Doctor Jorge E Osorio, Departamento de ciencias Patobiológicas de la Universidad de Wisconsin en Madison, USA.

Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia (LDSP)

Laboratorio de Inmunovirología, el Programa de estudio y control de enfermedades tropicales (Pecet) y el Grupo Biología y Control de Enfermedades Infecciosas—BCEI, de la Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

1. Padilla JC, Rojas P, Sáez R. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia [Internet]. 2012 [citado 18 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: https://www.academia.edu/7533149/Dengue_en_Colombia_epidemiolog%C3%ADa_de_la_reemergencia_a_la_hiperendemia
2. Fields' Virology [Internet]. [citado 17 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: http://books.google.es/books?id=5O0somr0w18C&pg=PR5&hl=es&source=gbs_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false
3. Wang W-K, Chao D-Y, Kao C-L, Wu H-C, Liu Y-C, Li C-M, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 20 de enero de 2003;305(2):330-8.
4. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. marzo de 2014;22(3):138-46.
5. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. febrero de 1990;174(2):479-93.
6. Lan NTP. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health*. diciembre de 2011;39(4 Suppl):73-81.
7. TDR | Dengue - Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control [Internet]. WHO. [citado 29 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/dengue-diagnosis-treatment/en/index.html>
8. Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. octubre de 2012;87(4):584-93.
9. Instituto Nacional De Salud [Internet]. Vigilancia Rutinaria. 2014. Recuperado a partir de: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
10. Estadísticas SIVIGILA - public [Internet]. [citado 12 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Estadsticas%20SIVIGILA/Forms/public.aspx>
11. Pan American Sanitary Bureau. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington, D.C: Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization; 1994. 98 p.
12. Lan NTP, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health*. diciembre de 2011;39(4 Suppl):73-81.

13. Trung DT, Thao LTT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PTD, et al. Liver Involvement Associated with Dengue Infection in Adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 10 de mayo de 2010;83(4):774-80.
14. Vasconcelos PF da C, Lima JWO, Raposo ML, Rodrigues SG, Rosa JFST da, Amorim SMC, et al. Seroepidemiologic survey in São Luis Island, State of Maranhão, Brazil, during a dengue fever epidemics. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 1999;32(2):171-9.
15. VASCONCELOS, Pedro F. C. Dengue epidemic in a Northeastern Brazil: random epidemiological serum survey. *Rev Saúde Pública.* octubre de 1998;32(5):447-54.
16. Yamashiro T, Disla M, Petit A, Taveras D, Castro-Bello M, Lora-Orste M, et al. Seroprevalence of IgG specific for dengue virus among adults and children in Santo Domingo, Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg.* agosto de 2004;71(2):138-43.
17. Restrepo, BN LT. Estudio seroepidemiológico de dengue en la región del Urabá Antioqueño-Colombia | Restrepo | Infectio. *Infect Rev Asoc Colomb Infectologia [Internet].* 2004 [citado 9 de febrero de 2016];8(4). Recuperado a partir de: <http://revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/article/view/267>
18. Rodríguez G. H, De La Hoz R. F. Dengue and dengue and vector behaviour in Cáqueza, Colombia, 2004. *Rev Salud Pública.* marzo de 2005;7(1):1-15.
19. Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, Imhoff L, Rodriguez Y, Saborío SI, et al. Alta prevalencia de anticuerpos contra el virus del dengue en un estudio prospectivo de niños en edad escolar en Managua, Nicaragua. *Trop Med Int Health.* 2006;11(6):935-42.
20. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. Epidemiology of Inapparent and Symptomatic Acute Dengue Virus Infection: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol.* 7 de enero de 2002;156(1):40-51.
21. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* enero de 1988;38(1):172-80.
22. Comach G, Blair PJ, Sierra G, Guzman D, Soler M, Quintana MC de, et al. Dengue Virus Infections in a Cohort of Schoolchildren from Maracay, Venezuela: A 2-Year Prospective Study. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* febrero de 2009;9(1):87-92.
23. Thai KTD, Binh TQ, Giao PT, Phuong HL, Hung LQ, Nam NV, et al. Seroprevalence of dengue antibodies, annual incidence and risk factors among children in southern Vietnam. *Trop Med Int Health.* 2005;10(4):379-86.
24. Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* abril de 2006;74(4):678-83.
25. Friebe P, Shi P-Y, Harris E. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *J Virol.* febrero de 2011;85(4):1900-5.

26. De La Guardia C, Leonart R. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Res Int* [Internet]. 2014 [citado 15 de octubre de 2015];2014. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4135166/>
27. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* octubre de 2009;11(10):1533-49.
28. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe.* 18 de octubre de 2012;12(4):544-57.
29. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu S-J, et al. Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. *J Investig Dermatol Symp Proc.* diciembre de 2001;6(3):219-24.
30. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J Exp Med.* 7 de abril de 2003;197(7):823-9.
31. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, et al. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* marzo de 2009;40(2):253-62.
32. Huang Y-H, Lei H-Y, Liu H-S, Lin Y-S, Chen S-H, Liu C-C, et al. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells. *J Med Virol.* 1 de agosto de 2003;70(4):610-6.
33. Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao H-M, Chokephaibulkit K, Perng GC, et al. Cells in Dengue Virus Infection In Vivo, Cells in Dengue Virus Infection In Vivo. *Adv Virol Adv Virol.* 12 de agosto de 2010;2010, 2010:e164878.
34. Rodenhuis-Z IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei H-Y, Wilschut J, et al. Immature Dengue Virus: A Veiled Pathogen? *PLoS Pathog* [Internet]. enero de 2010 [citado 18 de noviembre de 2015];6(1). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798752/>
35. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA, et al. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. *Virology.* 10 de abril de 2005;334(2):154-9.
36. Fischl W, Bartenschlager R. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* agosto de 2011;14(4):470-5.
37. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* octubre de 2008;80(1):11-22.
38. Yu I-Mei, Zhang Wei. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. 2008; Recuperado a partir de: <http://www.sciencemag.org/content/319/5871/1834.short>

39. Kurosu T. Quasispecies of dengue virus. *Trop Med Health*. diciembre de 2011;39(4 Suppl):29-36.
40. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Viol J*. 14 de septiembre de 2010;7:226.
41. Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, Mueller BA, et al. Phylogeography and Population Dynamics of Dengue Viruses in the Americas. *Mol Biol Evol*. junio de 2012;29(6):1533-43.
42. Dash PK, Sharma S, Soni M, Agarwal A, Sahni AK, Parida M. Complete genome sequencing and evolutionary phylogeography analysis of Indian isolates of Dengue virus type 1. *Virus Res*. 2 de enero de 2015;195:124-34.
43. Ocazonez-Jiménez RE, Ortiz-Báez AS, Gómez-Rangel SY, Miranda-Esquivel DR. Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander. *Biomédica*. 4 de septiembre de 2012;33(0):22-30.
44. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. septiembre de 2011;3(9):1562-608.
45. Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*. 1989;67(4):375-80.
46. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 14 de abril de 1997;230(2):244-51.
47. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. enero de 1994;75 (Pt 1):65-75.
48. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 15 de septiembre de 2002;301(1):148-56.
49. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Tenorio A, Rey GJ, Domingo C, Gallego-Gomez JC. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Viol J*. 2008;5:101.
50. Aquino VH, Amarilla AA, Alfonso HL, Batista WC, Figueiredo LTM. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. *PLoS One*. 2009;4(10):e7299.
51. Ospina MC, Diaz FJ, Osorio JE. Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. septiembre de 2010;83(3):672-8.

52. Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquivel DR, Jimenez REO. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health TM IH*. octubre de 2009;14(10):1241-50.
53. Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB de A, Silva de Lima CP, Carvalho VL, et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. noviembre de 2012;18(11):1858-64.
54. Halstead SB. Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu Rev Entomol*. 2008;53(1):273-91.
55. Vélez ID, Quiñones ML, Suárez M, Olano V, Murcia LM, Correa E, et al. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*. 1 de septiembre de 1998;18(3):192-8.
56. Cadavid JM, Rúa G, Campo O, Bedoya G, Rojas W. Cambios genéticos temporales y micro geográficos de *Aedes aegypti* de Medellín, Colombia. *Biomédica* [Internet]. 6 de octubre de 2014 [citado 5 de abril de 2015];35(1). Recuperado a partir de: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2343>
57. Rúa-Uribe GL, Suárez-Acosta C del R, Rojo RA. Epidemiological implications of *Aedes albopictus* (Skuse) in Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública*. diciembre de 2012;30(3):328-37.
58. Fernandez-Salas I F-LA. El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del dengue en Mexico. *Salud Publica Mex*. 1995;37(Supl):45-52.
59. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. noviembre de 2006;75(5):886-92.
60. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 12 de enero de 2001;65(6):848-51.
61. Lee I-K, Lee W-H, Liu J-W, Yang KD. Acute myocarditis in dengue hemorrhagic fever: a case report and review of cardiac complications in dengue-affected patients. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. octubre de 2010;14(10):e919-22.
62. Gulati S, Maheshwari A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health TM IH*. septiembre de 2007;12(9):1087-95.
63. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: a new challenge for neurology. *Neurol Int* [Internet]. 13 de noviembre de 2012 [citado 9 de febrero de 2016];4(3). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3555217/>
64. Natalia Houghton-Triviño DMS. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol*. 2009;91(Pt 3):697-706.
65. Malavige G, Fernando S, Fernando D, Seneviratne S. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. octubre de 2004;80(948):588-601.

66. Barnes WJ, Rosen L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg.* mayo de 1974;23(3):495-506.
67. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* julio de 2003;9(7):800-9.
68. Tuiskunen A, Monteil V, Plumet S, Boubis L, Wahlström M, Duong V, et al. Phenotypic and genotypic characterization of dengue virus isolates differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Arch Virol.* noviembre de 2011;156(11):2023-32.
69. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. SEROTYPE-SPECIFIC DIFFERENCES IN CLINICAL MANIFESTATIONS OF DENGUE. *Am J Trop Med Hyg.* 3 de enero de 2006;74(3):449-56.
70. Kumaria R. Correlation of disease spectrum among four Dengue serotypes: a five years hospital based study from India. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* abril de 2010;14(2):141-6.
71. Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol.* abril de 2000;60(4):432-8.
72. Suwandono A, Kosasih H, Nurhayati, Kusriastuti R, Harun S, Ma'roef C, et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* septiembre de 2006;100(9):855-62.
73. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* abril de 1970;42(5):350-62.
74. Porterfield JS. Immunological enhancement and the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *J Hyg (Lond).* diciembre de 1982;89(3):355-64.
75. Swanepoel AC, Stander A, Pretorius E. Flow cytometric comparison of platelets from a whole blood and finger-prick sample: impact of 24 hours storage. *Hematol Amst Neth.* marzo de 2013;18(2):106-14.
76. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis.* 15 de abril de 2007;195(8):1108-16.
77. Guzman MG, Vazquez S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses.* diciembre de 2010;2(12):2649-62.
78. Schieffelin JS, Costin JM, Nicholson CO, Orgeron NM, Fontaine KA, Isern S, et al. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol J.* 4 de febrero de 2010;7(1):28.

79. Beaumier CM, Rothman AL. Cross-Reactive Memory CD4+ T Cells Alter the CD8+ T-Cell Response to Heterologous Secondary Dengue Virus Infections in Mice in a Sequence-Specific Manner. *Viral Immunol.* junio de 2009;22(3):215-9.
80. Juffrie M, van der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJP, et al. Inflammatory Mediators in Dengue Virus Infection in Children: Interleukin-8 and Its Relationship to Neutrophil Degranulation. *Infect Immun.* febrero de 2000;68(2):702-7.
81. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res.* 2003;60:397-419.
82. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 25 de junio de 2008;8(1):86.
83. Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Alvarez LG. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* febrero de 2008;41(1):6-10.
84. Chacón-Duque JC, Adhikari K, Avendaño E, Campo O, Ramirez R, Rojas W, et al. African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in colombian populations. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* octubre de 2014;27:89-95.
85. Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* octubre de 2004;64(4):469-72.
86. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr, Feres VCR, Rocha B, Levi JE, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis.* 15 de marzo de 2008;197(6):817-24.
87. Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health.* 1 de septiembre de 2004;9(9):1022-9.
88. Nguyen TH, Nguyen TL, Lei H-Y, Lin Y-S, Le BL, Huang K-J, et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* abril de 2005;72(4):370-4.
89. Figueiredo MAA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JWO, Costa MCN, Morato V, et al. Allergies and Diabetes as Risk Factors for Dengue Hemorrhagic Fever: Results of a Case Control Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 1 de junio de 2010;4(6):e699.
90. Murphy BR, Whitehead SS. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annu Rev Immunol.* 2011;29(1):587-619.

91. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 12 de abril de 2012;366(15):1423-32.
92. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou J-L. Immunoglobulin A-Specific Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Fever. *J Clin Microbiol*. mayo de 1998;36(5):1189-92.
93. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. mayo de 2007;11(3):256-62.
94. 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*. abril de 1989;40(4):444-51.
95. Tan YY, Sekaran SD, Wang SM, Ahmed F, Hossain A, Sil BK. Development of ASSURE® Dengue IgA Rapid Test for the Detection of Anti-dengue IgA from Dengue Infected Patients. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(3):233-40.
96. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp ECM, et al. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol*. 1 de mayo de 2003;70(1):91-8.
97. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. febrero de 1993;48(2):222-9.
98. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignácio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. febrero de 2001;96(2):229-32.
99. Restrepo, BN, Ruth Ramirez, agudelo P. Características clínicas y niveles de citocinas en pacientes con dengue y su relación con la raza. [citado 19 de noviembre de 2015]; Recuperado a partir de: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=69310&id_seccion=383&id_ejemplar=6933&id_revista=22
100. Chua KB, Mustafa B, Abdul Wahab AH, Chem YK, Khairul AH, Kumarasamy V, et al. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. *Malays J Pathol*. junio de 2011;33(1):13-20.
101. Nisalak A. LABORATORY DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS INFECTIONS. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46 Suppl 1:55-76.
102. Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. noviembre de 2004;31(3):185-9.

103. Russell PK, Nisalak A. Dengue Virus Identification by the Plaque Reduction Neutralization Test. *J Immunol.* 8 de enero de 1967;99(2):291-6.
104. Van Panhuis WG, Gibbons RV, Endy TP, Rothman AL, Srikiatkachorn A, Nisalak A, et al. Inferring the serotype of dengue virus infections based on pre- and post-infection neutralizing antibody titers. *J Infect Dis.* 1 de octubre de 2010;202(7):1002-10.
105. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *Am J Trop Med Hyg.* 11 de enero de 2009;81(5):825-33.
106. Liu L, Wen K, Li J, Hu D, Huang Y, Qiu L, et al. Comparison of Plaque- and Enzyme-Linked Immunospot-Based Assays To Measure the Neutralizing Activities of Monoclonal Antibodies Specific to Domain III of Dengue Virus Envelope Protein. *Clin Vaccine Immunol CVI.* enero de 2012;19(1):73-8.
107. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Nisalak A, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Ogata SA, et al. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* noviembre de 2001;8(6):1150-5.
108. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis.* marzo de 2009;15(3):436-40.
109. Tontulawat P, Pongsiri P, Thongmee C, Theamboonlers A, Kamolvarin N, Poovorawan Y. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* mayo de 2011;42(3):570-8.
110. Fry SR, Meyer M, Semple MG, Simmons CP, Sekaran SD, Huang JX, et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Negl Trop Dis.* junio de 2011;5(6):e1199.
111. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology.* 2010;7:361.
112. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 16 de octubre de 2014 [citado 25 de marzo de 2015];8(10). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199549/>
113. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 25 de abril de 2013;496(7446):504-7.

114. WHO | Dengue and severe dengue [Internet]. [citado 12 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
115. Epidemiological Alert: Dengue 21 June 2013 [Internet]. [citado 12 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22101&Itemid=
116. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue fever: a call for local, national, and international action. *Lancet Lond Engl.* 19 de julio de 2008;372(9634):205.
117. Caprara A, Lima JW de O, Marinho ACP, Calvasina PG, Landim LP, Sommerfeld J. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. *Cad Saúde Pública.* 2009;25 Suppl 1:S125-36.
118. Arunachalam N, Tana S, Espino F, Kittayapong P, Abeyewickreme W, Wai KT, et al. Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: a multicountry study in urban and periurban Asia. *Bull World Health Organ.* marzo de 2010;88(3):173-84.
119. Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.* 2 de marzo de 2005;2(1):1.
120. Sly PD. Health impacts of climate change and biosecurity in the Asian Pacific region. *Rev Environ Health.* 2011;26(1):7-12.
121. Rúa-Uribe GL, Suárez-Acosta C, Chauca J, Ventosilla P, Almanza R. [Modelling the effect of local climatic variability on dengue transmission in Medellin (Colombia) by means of time series analysis]. *Bioméd Rev Inst Nac Salud.* septiembre de 2013;33 Suppl 1:142-52.
122. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2 de abril de 2011;84(2):200-7.
123. Wu P-C, Lay J-G, Guo H-R, Lin C-Y, Lung S-C, Su H-J. Higher temperature and urbanization affect the spatial patterns of dengue fever transmission in subtropical Taiwan. *Sci Total Environ.* 15 de marzo de 2009;407(7):2224-33.
124. Restrepo BN, Piedrahita LD, Agudelo IY, Parra-Henao G, Osorio JE. Frequency and Clinical Features of Dengue Infection in a Schoolchildren Cohort from Medellin, Colombia. *J Trop Med* [Internet]. 2012 [citado 9 de diciembre de 2014];2012. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530854/>
125. Alcaldía de Medellín [Internet]. [citado 17 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <https://www.medellin.gov.co/irj/portal/ciudadanos?NavigationTarget=navurl://55b5b9991e3f52260877cd67e5f45c97>
126. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) [Internet]. [citado 19 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.dane.gov.co/>

127. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* septiembre de 1998;36(9):2634-9.
128. Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg.* noviembre de 1979;28(6):1053-9.
129. Comprimidos dispersables [Internet]. UNICEF. [citado 18 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.unicef.org/spanish/supply/index_53571.html
130. Wright P, E N, M L, Mh J. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* junio de 1993;12(2):435-50.
131. Crowther JR. The ELISA guidebook [Internet]. Humana Press; 2000 [citado 19 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA48424994>
132. Greiner M, Franke CR, Böhning D, Schlattmann P. Construction of an intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of Trypanosoma evansi infections in a canine population in Brazil: a new approach towards an unbiased estimation of prevalence. *Acta Trop.* febrero de 1994;56(1):97-109.
133. Analisis Cluster Spss [Internet]. [citado 19 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://es.scribd.com/doc/139025168/Analisis-Cluster-Spss#scribd>
134. Wu, X, Kumar, V, Quinlan R. Top 10 algorithms in data mining - Springer. *Knowl Inf Syst.* diciembre de 2007;14(1):1-37.
135. Diaz, FJ HM, Ospina MC OJ. Molecular characterization of dengue viruses isolated in Medellin, Colombia and surrounding áreas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007, 77(5): 128-128.
136. Restrepo BN, Piedrahita LD, Agudelo IY, Marín K, Ramírez RE. Infección por dengue una causa frecuente de síndrome febril en pacientes de Quibdó, Chocó, Colombia. *Biomédica* [Internet]. 6 de octubre de 2014 [citado 5 de abril de 2015];35(1). Recuperado a partir de: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2345>
137. Christenbury JG, Aw PPK, Ong SH, Schreiber MJ, Chow A, Gubler DJ, et al. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. *J Virol Methods.* octubre de 2010;169(1):202-6.
138. Toan NT, Rossi S, Prisco G, Nante N, Viviani S. Dengue epidemiology in selected endemic countries: factors influencing expansion factors as estimates of underreporting. *Trop Med Int Health TM IH.* julio de 2015;20(7):840-63.
139. Thai KTD, Binh TQ, Giao PT, Phuong HL, Hung LQ, Van Nam N, et al. Seroprevalence of dengue antibodies, annual incidence and risk factors among children in southern Vietnam. *Trop Med Int Health TM IH.* abril de 2005;10(4):379-86.

140. Dayan G, Arredondo JL, Carrasquilla G, Deseda CC, Dietze R, Luz K, et al. Prospective Cohort Study with Active Surveillance for Fever in Four Dengue Endemic Countries in Latin America [Internet]. [citado 19 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.ajtmh.org>
141. Aralí Martínez-Vega R, Díaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA. Dificultad para el diagnóstico clínico temprano del dengue en un área endémica y su impacto sobre el manejo médico inicial. *Rev Médica Chile*. septiembre de 2006;134(9):1153-60.
142. Larrú Martínez B, Quiroz E, Bellón JM, Esquivel R, Nieto Guevara J, Sáez-Llorens X. [Dengue infection in children and adolescents in Panama]. *An Pediatría Barc Spain* 2003. junio de 2006;64(6):517-22.
143. Villar LA, Rojas DP, Besada-Lombana S, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. marzo de 2015;9(3):e0003499.
144. Teoh B-T, Sam S-S, Tan K-K, Johari J, Shu M-H, Danlami MB, et al. Dengue virus type 1 clade replacement in recurring homotypic outbreaks. *BMC Evol Biol*. 2013;13:213.
145. Ocazonez RE, Gómez SY, Cortés FM. [Dengue hemorrhagic fever serotype and infection pattern in a Colombian endemic area]. *Rev Salud Pública Bogotá Colomb*. junio de 2007;9(2):262-74.
146. Díaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martínez-Vega RA. Indicadores tempranos de infección por dengue en niños. *An Pediatría*. junio de 2006;64(6):523-9.
147. Restrepo BN, Beatty ME, Goez Y, Ramirez RE, Letson GW, Diaz FJ, et al. Frequency and Clinical Manifestations of Dengue in Urban Medellín, Colombia. *J Trop Med* [Internet]. 2014 [citado 18 de noviembre de 2015];2014. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060062/>
148. Endy TP, Anderson KB, Nisalak A, Yoon I-K, Green S, Rothman AL, et al. Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e975.
149. Méndez Á, González G. Dengue hemorrágico en niños: diez años de experiencia clínica. *Biomédica* [Internet]. 2003 [citado 19 de noviembre de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84323208>
150. Méndez A, González G. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. *Biomédica*. 1 de marzo de 2006;26(1):61-70.
151. Shuaib F, Todd D, Campbell-Stennett D, Ehiri J, Jolly PE. Knowledge, attitudes and practices regarding dengue infection in Westmoreland, Jamaica. *West Indian Med J*. marzo de 2010;59(2):139-46.
152. Benítez-Leite S, Machi ML, Gibert E, Rivarola K. Conocimientos, actitudes y prácticas acerca del dengue en un barrio de Asunción. *Rev Chil Pediatría*. enero de 2002;73(1):64-72.

153. dos Santos SL, Cabral ACDSP, Augusto LG da S. [Knowledge, attitude and practice on dengue, the vector and control in an urban community of the Northeast Region, Brazil]. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16 Suppl 1:1319-30.
154. González Morales A, Ibarra Sala AM. Nivel de conocimientos, actitudes y prácticas sobre la prevención del mosquito *Aedes aegypti* en comunidades del municipio Diez de Octubre, La Habana. *Rev Cuba Hig Epidemiol*. agosto de 2011;49(2):247-59.
155. Cáceres-Manrique F de M, Vesga-Gómez C, Perea-Florez X, Ruitort M, Talbot Y. [Knowledge, attitudes and practice regarding Dengue in two neighborhoods in Bucaramanga, Colombia]. *Rev Salud Pública Bogotá Colomb*. febrero de 2009;11(1):27-38.
156. Castañeda O SO. Conocimientos, actitudes y prácticas comunitarias en un brote de Dengue en un municipio de Colombia, 2010. *Rev Salud Pública Bogotá*. 2011;13(3):514-27.
157. Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bull Pan Am Health Organ*. 1989;23(4):397-404.

ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento y Asentimiento informado

¿QUE PASARÁ DURANTE EL ESTUDIO?

Primera etapa.

Este estudio comenzará en Abril de 2010, y tendrá una duración aproximada de dos años. En la primera etapa del estudio se incluirán todos los escolares cuyos padres o acudientes acepten participar y firmen este consentimiento informado.

Visita Número 1:

En esta etapa se hará la detección de casos de dengue en los escolares con síntomas o sin síntomas, para lo cual se tomará una muestra de sangre de 5mL. Así quedará conformado el grupo de escolares que participará en la segunda etapa del estudio.

Segunda etapa: Vigilancia del ausentismo escolar por fiebre.

El personal del estudio, conformado por una médica y una enfermera, asistirá diariamente a la institución educativa, donde indagarán por los niños ausentes en la jornada escolar.

Visita Número 2:

La médica y la enfermera, contactarán al padre o acudiente para conocer la causa de estar ausente en la jornada escolar. Si esta causa es enfermedad febril de 7 días o menos, el padre o acudiente podrá llevarlo a la Institución. Allí será evaluado por la médica del proyecto con un completo examen físico, se llenarán cuestionarios acerca de los hallazgos clínicos, factores de riesgo y el conocimiento sobre Dengue y se tomará una muestra de sangre de 5 mL para evaluar la presencia no solo del virus dengue, sino de otros microorganismos que también podrían estar causando esta sintomatología en el paciente. Adicionalmente se tomará una muestra de moco nasal para determinar infección por influenza (gripe).

NOTA: el tratamiento corre por cuenta de la Entidad Promotora de Salud (EPS) a la cual pertenece el paciente.

Visita Número 3:

Pasados 15 días de la consulta inicial el escolar será examinado nuevamente por la médica, se diligenciará un cuestionario y se le tomará otra muestra de sangre de 5 mL, para confirmar la infección por dengue.

NOTA: En caso de ser necesario el proyecto cubrirá los pasajes para acudir a esta cita.

Visitas adicionales:

De confirmarse que la causa de la fiebre fue infección por el virus del Dengue, usted será contactado por un miembro del equipo de investigación y se acordará con usted, si así lo desea, una cita en su casa para ser visitado por un grupo de expertos. Estos evaluarán su casa y sus alrededores para verificar la presencia de criaderos del mosquito transmisor del Dengue, completarán formularios acerca de cómo usted y su familia se protegen del mosquito, y tomarán una muestra de sangre de 5 mL a algunos miembros de su familia, para verificar si ellos también han tenido contacto con el virus. Finalmente se tomarán las coordenadas geográficas de su vivienda. Con estos datos se realizarán mapas que muestren las zonas de mayor riesgo en la ciudad. Igual procedimiento se hará con algunos de los casos que sean negativos para la infección por el virus del dengue.

Si su hijo(a) necesita ir al hospital, nosotros lo visitaremos cada día en el hospital y proporcionaremos consejo a su doctor sobre las recomendaciones más actuales para el tratamiento de dengue. También pediremos una muestra de sangre aproximadamente de 3cc, 14 días después de que su niño/a estuvo enfermo.

Durante los periodos de vacaciones mayores a 7 días lo llamaremos una vez a la semana para averiguar si su hijo ha tenido fiebre. En el caso de no poder ser atendido en la Institución Educativa se citará al Centro de Salud del Divino Maestro.

¿CUALES SON LOS RIESGOS EN EL ESTUDIO?

La enfermera del estudio le tomará a su hijo una muestra de 5 a 7 mililitros de sangre.
La toma de la muestra puede causar:

- Pequeña molestia al momento de introducir la aguja.
- Hematoma en el sitio de la punción que desaparece en pocos días.
- En raras ocasiones mareo o infección en el lugar de la punción.
- La cantidad extraída de sangre no causa anemia.
- La toma de la muestras de moco nasal puede causar molestia o un poco de dolor.

¿CUALES SON LOS BENEFICIOS AL FORMAR PARTE DEL ESTUDIO?

Usted y su(s) hijo(s) serán capacitados acerca de la enfermedad, el modo de transmisión, lugar de los criaderos, como prevenirlo, signos de alarma, entre otros.
Los exámenes serán gratuitos y les serán entregados los resultados de los mismos oportunamente.
Además, su participación, beneficiará la investigación, para conocer el verdadero riesgo de padecer la infección por dengue, conocer la presentación clínica en esta población y mejorar la prevención y el control.

¿QUIEN PUEDE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Pueden participar todos los estudiantes de 5 a 17 años de edad que cursen cualquier grado en la institución.

Su hijo podrá ser retirado de la investigación si:

- Abandona la Institución Educativa en los próximos 2 años (exceptuando los alumnos del grado undécimo)
- La médica del estudio cree que es mejor para su niño(a) terminar su participación en la investigación.
- La investigación es terminada por cualquier razón.

La información suministrada a los integrantes del estudio será confidencial. A cada paciente se le asignará un código que permitirá su identificación durante el análisis de los datos. Las muestras de sangre serán almacenadas y podrán ser utilizadas para estudios posteriores. Los resultados de las pruebas realizadas le serán entregados. La participación en el estudio será voluntaria y no tendrá ningún costo, usted tampoco recibirá compensación económica. Usted podrá retirarse del estudio en el momento en que lo considere necesario, sin que esto traiga consecuencias.

CONSENTIMIENTO DEL PADRE/TUTOR DEL ESTUDIANTE

Se contestaron todas mis preguntas con satisfacción. Me han explicado que la participación de mis hijos en este estudio es voluntaria y que el/ella puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento. Autorizo para la toma de la muestra de sangre de mi hijo/a para ser usada en la investigación y para que los investigadores puedan usar la información recolectada en los expedientes de mis hijos.

Firma del participante: _____ Código en el estudio _____

Firma del Padre o Acudiente (si es menor): _____ Fecha: _____

Firma del investigador: _____ Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____ Nombre: _____ Fecha: _____

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor contacte a la Dra. Berta Nelly Restrepo, teléfono: 3053500 ext: 2293 o 2280, Instituto Colombiano de Medicina Tropical.



ASENTIMIENTO INFORMADO

CARACTERIZACION DE LA INFECCION POR DENGUE EN ESCOLARES DE MEDELLIN, COLOMBIA

Responsable:

Dr. Bertha Nelly Restrepo, Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Antioquia, Colombia

Pertenece al Instituto Colombiano de Medicina Tropical y la Universidad CES y nuestro trabajo consiste en investigar si se presenta la enfermedad del dengue dentro de los estudiantes, que se siente cuando se esta enfermo, que tratamientos se usan, y los factores que hacen que la enfermedad este presente.

Hemos discutido esta investigación con tus padres y ellos saben que estamos preguntándote a ti para tener tu aceptación. Si vas a participar en la investigación tus padres también tienen que aceptarlo; pero si no deseas tomar parte de la investigación no tienes por qué hacerlo, aún cuando tus padres lo hayan aceptado.

- **¿En que consiste este estudio?**

Este estudio comenzará en mayo de 2010 y tendrá una duración aproximada de dos años.

Primera Etapa:

Se incluirá a todos los estudiantes cuyos padres o acudientes hayan firmando el consentimiento informado y ahora pedimos tu autorizando firmando este asentimiento informado.

En esta primera etapa se hará la detección de casos de dengue en estudiantes como tú que presento o no síntomas, para lo cual te tomaremos una muestra de sangre de 5 ml.

Segunda Etapa:

El personal del estudio, conformado por un médico y un enfermero, asistirá diariamente a la institución educativa, donde preguntarán por los niños ausentes en la jornada escolar. Si eres tu el que está enfermo, llamaremos a tus padres o a ti, y preguntaremos por el motivo de tu ausencia. Si ésta se debe a enfermedad con fiebre de menos de 7 días, tú, con uno de tus padres tendrán la opción de visitar la institución donde serás evaluado por un médico, se llenarán unas pequeñas encuestas y una enfermera te tomará una muestra de sangre. Deberás volver pasados 15 días de la consulta inicial para tomar otra muestra de sangre.

Visita Número 1:

Como dijimos anteriormente, tu o uno de tus padres serán llamados por un miembro del estudio para preguntar el motivo de tu ausencia a la institución, y posteriormente serán citados para que un medico te evalúe con un completo examen físico, le haga unas preguntas a tu padre/madre sobre los factores de riesgo y el conocimiento del Dengue, y un enfermero te tome una muestra de sangre para evaluar la presencia del virus en ti. NOTA: No se te dará ninguna clase de tratamiento, este correrá por cuenta de la EPS a la cual perteneces.

Visita Número 2:

Tú, con uno de tus padres, serán citados para una nueva cita pasados 15 días de la consulta inicial. En esta cita serás examinado por el medico, se llenará un pequeño cuestionario y te tomaremos una nueva muestra de sangre.

- **¿Por qué me necesitan a mí?**

Porque vives en una zona donde se presentan muchos casos de la enfermedad y porque el dengue puede infectar a cualquier persona, incluso, a ti.

- **¿Es obligatorio participar?**

No. No tienes por qué participar en esta investigación si no lo deseas. Si decides no hacerlo no ocurrirá nada. Incluso, si decides participar ahora puedes cambiar de idea después.

- **¿Cuáles son los beneficios?**

Tu, tus padres, profesores y compañeros serán capacitados a cerca de la enfermedad, modo de transmisión, lugar de los criaderos, como prevenirlo, signos de alarma, entre otros.

A ti y/o a tus padres les entregaremos los resultados de los exámenes practicados por el estudio, confirmando si tenías o no, infección por el virus.

Además, tu participación beneficiará el estudio, pues queremos saber el verdadero riesgo de tener la enfermedad, la presentación clínica en los estudiantes y mejorar las campañas de prevención y control.

- **¿Cuáles podrían ser los riesgos?**

Los riesgos son mínimos, pero en algunas ocasiones la toma muestra de sangre puede causarte:

- Pequeña molestia o dolor que durara poco segundos al momento de introducir la aguja.
- En algunas ocasiones una coloración morada en el sitio de la introducción de la aguja que desaparece en pocos días.
- Algunas veces puede causarte mareo o
- También en muy raras ocasiones puedes sentir enrojecimiento e hinchazón en el sitio de toma de la muestra, incluso puedes llegar a sentirte mal, lo cual debes informar a tus padres o a nosotros inmediatamente.
- La cantidad extraída de sangre no causa anemia ni ningún tipo de deficiencia.

No diremos a otras personas que estas en ésta investigación y no compartiremos información sobre ti a nadie que no trabaje en el estudio de investigación. Cuando la investigación finalice, se les dirá a los resultados.

La información sobre ti recogida por la investigación será retirada y nadie sino los investigadores podrán verla. Cualquier información sobre ti tendrá un número en vez de tu nombre. Solo los investigadores sabemos cuál es tu número y se guardará la información con llave. No será compartida ni dada a nadie excepto el personal del estudio.

Yo: _____, firma _____

que pertenezco a la Institución Educativa: _____

Acepto _____ No acepto _____ participar en el estudio "CARACTERIZACION DE LA INFECCION POR DENGUE EN ESCOLARES DE MEDELLIN, COLOMBIA".



INSTITUTO VECES
DE MEDICINA Y CIENCIAS
DE MEDELLIN



Pediatric DENGUE
VACCINE INITIATIVE



UNIVERSITY OF
WISCONSIN
MEDICINE



UNIVERSIDAD CES
CENTRO DE ESTUDIOS Y SERVICIOS

ANEXO 2. Formulario clínico y de seguimiento

DSN _____

**REPORTE INVESTIGACION CASOS DE DENGUE
CARACTERIZACION DE LA INFECCION POR DENGUE
EN ESCOLARES DE MEDELLÍN, ANTIOQUIA, COLOMBIA**

PEGATINA de
CODIGO DE BARRAS

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1 Fecha (DD/MM/AA) ____/____/____

1.2 Paciente ID _____ 1.3 Sexo Hombre Mujer 1.4 Fecha de Nacimiento: (DD/MM/AA) ____/____/____

1.5 Peso ____ Kg Signos Vitales: 1.6 Temperatura ____ 1.7 Pulso ____ 1.8 Resp ____ 1.9 P/A ____/____

1.10 Prueba torniquete: No. petequias: 0 Entre 1 a 9 Entre 10 a 19 >19

1.11 Fecha de inicio de la fiebre (DD/MM/AA) ____/____/____

2. HISTORIA CLINICA		2.3 RESPIRATORIO		2.5 OTROS SINTOMAS	
2.1 ESTADO GENERAL		Si	No	SD	
2.1.1 Fiebre					
2.1.2 Rash					
2.1.3 Inconsciencia					
2.1.4 La energía baja o fatiga					
2.1.6 Depresión					
2.2 CABEZA		2.4 GASTROINTESTINAL		2.6 MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS	
2.2.1 Dolor de cabeza		2.4.1 Pérdida de apetito		2.5.1 Dolor al orinar	
2.2.2 Dolor retroocular		2.4.2 Náusea		2.5.2 Lumbalgia	
2.2.3 Dolor en el cuello		2.4.3 Vómito		2.5.3 Mialgia	
2.2.4 Otagia		2.4.3.1 Vómito persistente		2.5.4 Artralgia	
2.2.5 Congestión nasal		2.4.4 Dolor abdominal		2.5.5 Convulsión	
2.2.6 Rinorrea		2.4.5 Estreñimiento		2.5.6 Parálisis	
2.2.7 Dolor de garganta		2.4.6 Diarrea		2.5.7 Paresia	
		2.4.6.1 Líquida		2.5.8 Parastesia	
		2.4.6.2 Mancha de sangre			
		2.4.6.3 Mucoide			
3. EXAMEN FISICO		3.2 RESPIRATORIO		3.4 EXTREMIDADES	
3.1 CABEZA Y CUELLO		Si	No	Si	No
3.1.1 Rubor facial				3.4.1 Edema extremidades	
3.1.2 Conjuntiva inyectada		3.2.1 Dolor intercostal		3.4.2 Adenopatía: <input type="checkbox"/> Axilar <input type="checkbox"/> Inguinal	
3.1.3 Secreción conjuntival		3.2.2 Sibilancias		3.4.3 Llenado capilar (seg)	
3.1.4 Conjuntiva icterica		3.2.3 Crépitos		3.4.4 Cianosis	
3.1.5 Ojos hundidos		3.2.4 Roncus			
3.1.6 Otitis media		3.2.5 Derrame pleural		3.5 CUTÁNEO	
3.1.7 Cianosis perioral		3.3 GASTROINTESTINAL		3.5.1 Equimosis	
3.1.8 Eritema en garganta		3.3.1 Dolor abdominal		3.5.2 Petequias	
3.1.9 Exudado en garganta		3.3.2 Distensión abdominal		3.5.3 Rash: <input type="checkbox"/> Generalizado <input type="checkbox"/> Localizado	
3.1.10 Petequias en mucosa		3.3.3 Ascitis		3.5.4 Rash: <input type="checkbox"/> Macular <input type="checkbox"/> Papular	
3.1.11 Lengua o mucosas secas		3.3.4 Esplenomegalia (cm)		3.5.5 Rash eritematoso	
3.1.12 Rigidez de cuello		3.3.4 Hepatomegalia (cm)		3.5.6 Ictericia	
3.1.13 Adenopatía cervical				3.5.7 Pliegue cutáneo	
4. LABORATORIO		4.6 Linfocitos (%)		4.12 Leucocitos en orina	
4.1 Plaquetas (x 1000)	Resultado				
4.2 Hematocrito (%)		4.7 Monocitos (%)		4.13 Nitritos	
4.3 Hemoglobina (g/dL)					
4.4 Leucocitos (x 1000)		4.8 <input type="checkbox"/> Proteína <input type="checkbox"/> Albumina (g/dL)		4.14 Eritrocitos en orina	
4.5 Segmentados (%)					
		4.9 AST (U/L)		4.15 Bilirrubinuria	
		4.10 ALT (U/L)		4.16 Proteinuria	
		4.11 Bilirrubina (mg/dL)		4.17 X Rayos	
5. DIAGNOSTICO PRESUNTIVO		5.6 Síndromes viral		6. DISPOSICION PACIENTE	
5.1 Infección por dengue					
5.2 Gripe		5.7 Otitis media		6.1 Ambulatorio	
5.3 Influenza					
5.4 Bronquitis		5.8 Infección urinaria		6.2 Consultó al médico	
5.5 Neumonía					
		5.9 Diarrea		6.3 Hospitalizado	
		5.10 Otras		Lugar	
		Cuál(es)			
7. TRATAMIENTOS					
8. COMENTARIOS (Incluya otros resultados aquí)					
9. DATOS DE MANEJO					
9.1 El paciente fue examinado por/Evaluado por	Nombre	Firma	Fecha	Comentarios	
9.2 Muestra tomada por					
9.3 Formulario y Muestra transportada por					
9.4 Formulario revisado por					

PDVI, Form A - Version 1.0

27/02/2010

DSN _____

**SEGUIMIENTO CASOS DE DENGUE
EN ESCOLARES DE MEDELLÍN, ANTIOQUIA, COLOMBIA**

PEGATINA de
CODIGO DE BARRAS

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.2 Paciente ID _____

1.3 Sexo Hombre Mujer

1.1 Fecha (DD/MM/AA) ___/___/___

1.4 Fecha de Nacimiento: (DD/MM/YY) ___/___/___

1.5 Siente que ya se curó de su enfermedad Si No

1.6 Por cuántos días estuvo usted enfermo: _____

2. SINTOMAS ESTABA ENFERMO				2.3 RESPIRATORIO			2.5 OTROS SINTOMAS		
	Si	No	SD	Si	No	SD	Si	No	SD
2.1 ESTADO GENERAL				2.3.1 Tos			2.5.1 Dolor al orinar		
2.1.1 Fiebre				2.3.1.1 Tos productiva			2.5.2 Lumbalgia		
2.1.2 Rash				2.3.2 Dificultad respiratoria			2.5.3 Mialgia		
2.1.3 La energía baja o fatiga				2.4 GASTROINTESTINAL			2.5.4 Artralgia		
2.1.4 Depresión				2.4.1 Pérdida de apetito			2.5.5 Convulsión		
2.2 CABEZA				2.4.2 Náusea			2.5.6 Parálisis		
2.2.1 Dolor de cabeza				2.4.3 Vómito			2.5.7 Paresia		
2.2.2 Dolor retroocular				2.4.3.1 Vómito persistente			2.5.8 Parastesia		
2.2.3 Dolor en el cuello				2.4.4 Dolor abdominal			2.6 MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS		
2.2.4 Otagia				2.4.5 Estreñimiento			2.6.1 Hemorragia nasal		
2.2.5 Congestión nasal				2.4.6 Diarrea			2.6.2 Hemorragia de las encías		
2.2.6 Rinorrea				2.4.6.1 Líquida			2.6.3 Vómito con sangre		
2.2.7 Dolor de garganta				2.4.6.2 Mancha de sangre			2.6.4 Sangre en la excreta		
				2.4.6.3 Mucoide			2.6.5 Sangre en la orina		
							2.6.6 Flujo menstrual incrementado		

SI LOS SÍNTOMAS DEL PACIENTE HAN TERMINADO, CONTINÚE A LA SECCIÓN 4: ESTADO GENERAL DE SALUD

3. SINTOMAS PERSISTENTES				3.3 RESPIRATORIO			3.5 OTROS SÍNTOMAS		
	Si	No	SD	Si	No	SD	Si	No	SD
3.1 ESTADO GENERAL				3.3.1 Tos			3.5.1 Dolor al orinar		
3.1.1 Fiebre				3.3.1.1 Tos productiva			3.5.2 Lumbalgia		
3.1.2 Rash				3.3.2 Dificultad respiratoria			3.5.3 Mialgia		
3.1.3 La energía baja o fatiga				3.4 GASTROINTESTINAL			3.5.4 Artralgia		
3.1.4 Depresión				3.4.1 Pérdida de apetito			3.5.5 Convulsión		
3.2 CABEZA				3.4.2 Náusea			3.5.6 Parálisis		
3.2.1 Dolor de cabeza				3.4.3 Vómito			3.5.7 Paresia		
3.2.2 Dolor retroocular				3.4.3.1 Vómito persistente			3.5.8 Parastesia		
3.2.3 Dolor en el cuello				3.4.4 Dolor abdominal			3.6 MANIFESTACIONES HEMORRÁGICAS		
3.2.4 Otagia				3.4.5 Estreñimiento			3.6.1 Hemorragia nasal		
3.2.5 Congestión nasal				3.4.6 Diarrea			3.6.2 Hemorragia de las encías		
3.2.6 Rinorrea				3.4.6.1 Líquida			3.6.3 Vómito con sangre		
3.2.7 Dolor de garganta				3.4.6.2 Mancha de sangre			3.6.4 Sangre en la excreta		
				3.4.6.3 Mucoide			3.6.5 Sangre en la orina		
							3.6.6 Flujo menstrual incrementado		

4. ESTADO GENERAL DE SALUD

4.1 ¿Cómo calificaría su salud antes de esta enfermedad? Muy Buena Buena Regular Mala Muy Mala

4.2 ¿Cómo calificaría su salud cuando la enfermedad estuvo en su peor momento? Muy Buena Buena Regular Mala Muy Mala

4.3 ¿Cuántos días el paciente se sintió o "mal" o "muy mal?" _____

4.4 ¿Cuánta dificultad tuvo usted para asistir al estudio, al trabajo o en las actividades del hogar durante la enfermedad?
 Ninguna Media Moderada Severa Extrema/Usted no pudo moverse

4.5 ¿Cómo calificaría su salud hoy? Muy Buena Buena Regular Mala Muy Mala

5. COMENTARIOS

6. DATOS DE MANEJO

	Nombre	Firma	Fecha	Comentarios
6.1 El paciente fue examinado por/Evaluado por				
6.2 Muestra tomada por				
6.3 Formulario y Muestra transportada por				
6.4 Formulario revisado por				

ANEXO 3. Formulario estudio serológico anual

DSN (No llenar)

PEGATINA de
CODIGO DE BARRAS

CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR DENGUE EN ESCOLARES DE MEDELLÍN, ANTIOQUIA, COLOMBIA INSPECCIÓN ANUAL

La encuesta debe ser respondida por un adulto. Por favor utilice lapicero

1. INFORMACIÓN GENERAL DEL ESCOLAR (Las preguntas 1.2 a 1.14 son acerca del escolar) 1.1 FECHA (D/M/A) ___/___/___

1.2 Institucion Educativa : Colegio UPB IESamuel Barrientos Restrepo Otra Cuál _____

1.3 Paciente ID (No llenar) 1.4 Grado escolar ___ 1.5 Barrio _____ 1.6 Estrato socioeconómico ___ (Según servicios públicos)

1.7 Tiene EPS: Si No Cuál: _____ 1.8 Fecha de Nacimiento del escolar (D/M/A) ___/___/___ Edad (años): _____

1.9 Sexo Hombre Mujer 1.10 Raza: Mestizo Afro-Colombiano Otra _____

1.11 El escolar ha sido vacunado contra fiebre amarilla Si No No sabe. Año _____

1.12 El escolar ha tenido dengue alguna vez: Si No No sabe. 1.13 Ha presentado fiebre en los últimos 3 meses: Si No

1.14 Ha presentado fiebre en los últimos 7 días: Si No

1.15 ¿Quién responde esta encuesta?: Madre Padre Otro 1.16 Edad _____ 1.17 Número de personas en la vivienda: _____

1.18 Nivel Educativo de quien responde la encuesta: Primaria Secundaria Universitario Tecnología Posgrado Ninguno

2. RESPONDA SI O NO DE ACUERDO A SUS CONOCIMIENTOS SOBRE DENGUE (pueden ser una o varias respuestas. Señalar con X)

<p>2.1 ¿QUÉ ES EL DENGUE?</p> <p>2.1.1 Una enfermedad <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.1.2 Un Zancudo <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.1.3 Otro <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.1.4 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.5 ¿USTED O SU FAMILIA PUEDEN SUFRIR DENGUE?</p> <p><input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p>	<p>2.9 LOS INSERVIBLES DE SU CASA SON ELIMINADOS POR:</p> <p>2.9.1 El municipio <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.9.2 Recicladores <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.9.3 Por la familia/otro <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.9.4 Ninguno <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>
<p>2.2 ¿CUALES SON LOS SINTOMAS</p> <p>2.2.1 Fiebre <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.2 Dolor de cabeza <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.3 Dolor en todo el cuerpo <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.4 Brote <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.5 Hemorragias <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.6 Vómitos <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.7 Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.8 Otros <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.2.9 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.6 ¿QUE HACE PARA PREVENIR EL DENGUE?</p> <p>2.6.1 Drena las canoas <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.2 Lava el tanque del agua <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.3 Fumiga <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.4 Guarda los inservibles bajo techo <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>Lava cada 2 o 3 días los siguientes utensilios?</p> <p>2.6.5 Escurridores de matas <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.6 Platos de mascotas <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.7 Floreros <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.8 Otra actividad. Cuál? _____ <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.9 Ninguna medida <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p> <p>2.6.10 No sabe <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si</p>	<p>2.10 CARACTERISTICAS DE LA VIVIENDA</p> <p>2.10.1 Suministro regular agua <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.10.2 Recolección regular de basuras <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>
<p>2.3 ¿COMO SE TRANSMITE?</p> <p>2.3.1 Contacto con un enfermo <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.3.2 Contacto con utensilios usados por el enfermo <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.3.3 Alimentos o agua contaminados <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.3.4 Picadura de mosquito <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.3.5 Otro <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.3.6 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.7 CERCA A SU VIVIENDA HAY:</p> <p>2.7.1 Construcciones <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.7.2 Cementerios <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.7.3 Llantas abandonadas <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.7.4 Piscina/alberca <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.7.5 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.11 ¿USTED HA VISTO ZANCUDOS:</p> <p>2.11.1 En la casa <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.11.2 En el colegio <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.11.3 Otro lugar <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.11.4 No ha visto <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>
<p>2.4 ¿QUE HACE CUANDO USTED O SU FAMILIA TIENEN DENGUE?</p> <p>2.4.1 Consulta al Médico <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.4.2 Se automedica <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.4.3 Se cuida en casa <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.4.4 Consulta a la farmacia <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.4.5 Nada <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.4.6 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.8 EN SU VIVIENDA TIENE:</p> <p>2.8.1 Floreros <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.2 Matas sembradas en agua <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.3 Platos de mascotas <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.4 Escurridores de matas <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.5 Tanques con agua sin tapa <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.6 Inservibles a la intemperie <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.8.7 Piscina/alberca <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p>2.12 LUGARES DONDE SE REPRODUCE EL ZANCUDO</p> <p>2.12.1 Quebradas/rios/caños <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.12.2 Agua limpia estancada <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.12.3 Basuras <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.12.4 No sabe <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>
		<p>2.13 MEDIOS POR LOS CUALES HA RECIBIDO INFORMACIÓN SOBRE EL DENGUE</p> <p>2.13.1 Televisión <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.13.2 Radio <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.13.3 Periódicos/revistas <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.13.4 Personal de salud/folletos <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.13.5 Internet <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>2.13.6 Otros <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p> <p>Cuál(es)? _____</p>

¡MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!

ANEXO 4. Lista de primers utilizados para la amplificación y secuenciación del gen de la envoltura del virus DENV-1

ID primer	Secuencia	RT	PCR	SECUENCIACION
D1F5R	5'-TTTGTCGGTCTGGGGGGGTATAGAACCTGTTGATTCAACRGC-3'	X		
D1F1F	5'-GATGAGGGAAGATGGGGAGTTGTTAGTCTACGTGGAC-3'		X	X
D1F1R	5'-CCAATGGCYGCTGAYAGTCT-3'		X	X
D1F2F	5'-GGYTCTATAGGAGGRGTTCAC-3'		X	
D1F2R	5'-TTCCACTTCYGGAGGGCT-3'		X	
D1-1	5'-AAACGTTCCGTSGCACTGGC-3'			X
D1-2	5'-CGTCTTCAAGAGTTCAATGTCC-3'			X
D1-3	5'-TGTGTGTCGMCGAACGTT-3'			X
D1-4	5'-GTTTGTGGACRAGCCATGATT-3'			X
D1-5	5'-GCAATGCACACYGCGTTG-3'			X
D1-6	5'-AAAGGTGGYTCYGYTCAAT-3'			X

La X indica en que reacción fue utilizado el primer, RT= transcripción reversa; PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa; Secuenciación tipo sanger.

ANEXO 5. Tabla 19 Información secuencias del DENV-1 utilizadas en el análisis filogenético

N°	Identificación	Origen Ciudad y/o País	Año de aislamiento	Genotipo	Identificador en Genbank
1	728	Medellín-Antioquia, Colombia	1993	V	N.A
2	1008	Medellín-Antioquia, Colombia	1994	V	N.A
3	029	Medellín-Antioquia, Colombia	1995	V	N.A
4	1069	Medellín-Antioquia, Colombia	1997	V	N.A
5	006	Medellín-Antioquia, Colombia	1998	V	N.A
6	14135	Bello-Antioquia, Colombia	2002	V	N.A
7	8379	Girardota-Antioquia, Colombia	2003	V	N.A
8	11429	Medellín-Antioquia, Colombia	2003	V	N.A
9	102	Medellín-Antioquia, Colombia	2003	V	N.A
10	514LAS	Quibdó-Chocó, Colombia	2008	V	N.A
11	941RDP	Quibdó-Chocó, Colombia	2010	V	N.A
12	954JER	Quibdó-Chocó, Colombia	2010	V	N.A
13	918CM	Quibdó-Chocó, Colombia	2010	V	N.A
14	U0023	Medellín-Antioquia, Colombia	2010	V	N.A
15	U0009	Medellín-Antioquia, Colombia	2010	V	N.A
16	EZR	Medellín-Antioquia, Colombia	2010	V	N.A
17	S0219	Medellín-Antioquia, Colombia	2011	V	N.A
18	MOCHIZUKI	Japón	1943	I	AB074760.1

19	16007 Pkd13	Tailandia	1964	II	AF180817.1
20	IBH28328	Nigeria	1968	V	AF425625.1
21	40553	Myanmar	1971	V	AY713473.1
22	P72_1244	Malasia	1972	III	AF231721.1
23	17646	Isla Nauru, Pacifico Occidental	1974	IV	U88536.1
24	PRS228682	Filipinas	1974	IV	AF425627.1
25	PRS288690	Jamaica	1977	V	AF425621.1
26	780572	Trinidad y Tobago	1978	V	AF425631.1
27	PUO359	Tailandia	1980	I	AF425630.1
28	1298	Yucatán, México	1980	V	AF425623.1
29	AR404147	Be, Brasil	1982	V	AF425613.1
30	HCS1	Australia	1983	IV	AF425611.1
31	1463	Sonora, México	1984	V	DQ341190.1
32	495	Aruba	1985	V	AF425609.1
33	347869_	Colombia	1985	V	AF425616.1
34	Dakar_A150	Costa de Marfil	1985	V	AF425620.1
35	86471	Trinidad y Tobago	1986	V	AF425639.1
36	French_Gua yana	Guyana Francesa	1989	V	AF226687.2
37	45907	Ms, Brasil	1991	V	KF672791.1
38	DEI0151	Peru_91	1991	V	AF425626.1
39	BC126 (3425)	Yucatán, México	1994	V	DQ341192.1
40	VEPOR	Venezuela	1994	V	AF425636.1

41	125239	Venezuela	1994	V	AF425637.1
42	VEAMA	Venezuela	1995	V	AF425632.1
43	VEDTF	Venezuela	1995	V	AF425633.1
44	SLMC28	Sri Lanka	1995	IV	AY422784.1
45	NI04VI04	Nicaragua	1996	V	DQ016656.1
46	371869	Colombia_96	1996	V	AF425617.1
47	NI06VI04	India	1996	V	DQ016652.1
48	28164_	Venezuela	1997	V	AF425634.1
49	V3540	Aragua, Venezuela	1997	V	GU056029.1
50	58485	Mg, Brasil	1997	V	KF672769.1
51	NI11VI04	Tailandia	1998	I	DQ016646.1
52	60443	Ce, Brasil	1998	V	KF672775.1
53	1056	Abidjan, Costa de Marfil	1998	V	AF298807.1
54	V3377	Santander, Colombia	1998	V	GQ868560.1
55	V7291	Santander, Colombia	1998	V	KJ189303.1
56	V3378	Santander, Colombia	1999	V	GQ868561.1
57	64616	Rj, Brazil	1999	V	KF672792.1
58	V2171	Aragua, Venezuela	1999	V	FJ639743.1
59	V3548	Aragua, Venezuela	2000	V	GU131832.1
60	67993	Pi, Brasil	2000	V	KF672787.1
61	293	Argentina	2000	V	AY206457.3
62	280	Paraguay	2000	V	AF514878.2
63	V3379	Santander, Colombia	2001	V	GU131948.1
64	BR01	MR, Brasil	2001	V	AF513110.1

65	73834	Espíritu Santo, Brasil	2001	V	KF672789.1
66	SC411VI03	Polinesia Francesa	2001	IV	DQ016651.1
67	GZ80	Gz, China	2001	I	AF350498.1
68	75424	Es, Brasil	2002	V	KF672783.1
69	SA079	Filipinas	2002	I	AY422783.1
70	49440	Myanmar	2002	I	JF459993.1
71	CNM438VI03	Nicaragua	2003	V	DQ016657.1
72	NI12VI04	Tailandia	2003	I	DQ016649.1
73	SK1222VI04	India	2003	V	DQ016655.1
74	AF1561VI04	Tailandia	2004	I	DQ016650.1
75	01B	Hawáii, EUA	2005	IV	DQ091259.1
76	V2251	Aragua, Venezuela	2005	V	FJ639813.1
77	V3558	Aragua, Venezuela	2005	V	GU131837.1
78	V3380	Santander, Colombia	2005	V	GQ868562.1
79	V3382	Santander, Colombia	2006	V	GQ868564.1
80	V3385	Santander, Colombia	2006	V	GQ868565.1
81	V2606_	Mérida, Venezuela	2006	V	JN819405.1
82	V3566	Aragua, Venezuela	2006	V	KF955414.1
83	BeH739688	Amazonas, Brasil	2007	V	HM450103.1
84	V3387	Santander, Colombia	2007	V	GQ868567.1
85	DB013	Venezuela	2007	V	JF804026.1
86	V3391	Santander, Colombia	2008	V	GQ868570.1
87	GUYANA	Guyana Francesa	2008	V	JN415506.1

88	480513060	Martinica	2008	V	JN022597.1
89	1844_13	Hanoi, Vietnam	2008	I	KC861935.1
90	10901007_4	Hanoi, Vietnam	2009	I	KC861968.1
91	1181_15	NhaTrang, Vietnam	2009	I	KC861927.1
92	DB067	Haiti	2010	V	JF969282.1
93	G7	México	2010	V	JQ065945.1
94	J8	México	2010	V	JQ065956.1
95	ARC_31	Puerto Rico, EUA	2010	V	JQ045563.1
96	DB095	Puerto Rico, EUA	2010	V	JX402213.1
97	ARC_39	Florida, EUA	2010	V	JQ045564.1
98	11801	Guangzhou, China	2010	I	JN009088.1
99	12375	Gz, China	2010	IV	JN009090.1
100	876	Ms, Brasil	2010	V	KF672768.1
101	514	Rio de Janeiro, Brasil	2011	V	KF672784.1
102	160412_791	Nueva Caledonia	2012	I	KC316022.1
103	V7713	Puerto Rico, EUA	2012	V	KJ189358.1
104	V7719	Puerto Rico, EUA	2012	V	KJ189359.1
105	Hawaii_44	Hawaii, EUA	1944	IV	AB609588.1

N.A=No aplica porque no se han incluido