

VIREMIA, ANTIGENEMIA E INFECCIÓN NATURAL DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN NIÑOS CON DENGUE:  
¿DETERMINAN SEVERIDAD CLINICA?

**Presentado por:**

Juan David Rojas Perdomo

.

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTA DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA  
NEIVA-HUILA  
2016

VIREMIA, ANTIGENEMIA E INFECCIÓN NATURAL DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN NIÑOS CON DENGUE:  
¿DETERMINAN SEVERIDAD CLINICA?

Juan David Rojas Perdomo

Trabajo de grado presentado como requisito para optar a título de Médico

Asesor  
Gilberto Astaiza MD, PhD Salud Pública  
Docente Técnicas de Investigación II

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTA DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA  
NEIVA-HUILA  
2016

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---



---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Neiva, Noviembre del 2016

A MIS PADRES, RESPONSABLES  
EN GRAN MEDIDA DE LO QUE  
HOY SOY. A MI NOVIA,  
MI PARTE HUMANA.

JUAN DAVID

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Al Dr. Carlos Fernando Narváez. PhD en inmunología. Por su asesoría, apoyo y enseñanzas para la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Gilberto Astaiza. PhD en salud pública, Por su gran apoyo, asesoría y confianza para la realización de esta investigación.

Al grupo de investigación de Medicina y Parasitología Tropical de la Universidad Surcolombiana. Categoría A1 en Colciencias. Por su disponibilidad, tiempo y apoyo.

Al personal de Salud del hospital Universitario de Neiva Huila. Servicio de Infectología. Parte la atención integral y de calidad a nuestros niños.

En general a todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron en la realización de este proyecto de investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	16
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MARCO TEÓRICO	24
5.1 CARACTERÍSTICAS DEL DENGUE Y SU INMUNOPATOGENESIS	24
5.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN DENGUE	25
5.3 VIREMIA Y ANTIGENEMIA EN DENGUE	27
5.4 INFECCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS HUMANAS POR VIRUS DENGUE	29
6. HIPÓTESIS	31
7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	32
8. DISEÑO METODOLÓGICO	33
8.1 TIPO DE ESTUDIO	33

	Pág.
8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO	33
8.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	33
8.3.1 Población.	33
8.3.2 Muestra y muestreo.	33
8.4 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	34
8.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	35
8.5.1 ELISA para la detección de inmunoglobulinas específicas de DENV y la proteína viral NS1 en plasma.	35
8.5.2 Evaluación semicuantitativa de la antigenemia en niños con dengue.	36
8.5.3 Aislamiento del ARN para la RT-PCR y qPCR.	36
8.5.4 Evaluación de la carga viral en plasma por qPCR.	36
8.5.5 Criopreservación y descongelación de CMSP.	37
8.5.6 Detección de células mononucleares de sangre periférica infectadas naturalmente con DENV.	38
8.5.7 Seguimiento clínico y paraclínico de los niños incluidos.	39
8.6 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	39
8.8 ASPECTOS ÉTICOS	40
9. RESULTADOS	41

	Pág.
9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE NIÑOS CON DENGUE	41
9.2 ELEVACIÓN TEMPRANA DE LA VIREMIA Y LA ANTIGENEMIA DURANTE LA INFECCIÓN DEL DENGUE	43
9.3 LOS MONOCITOS FUERON LAS PRINCIPALES CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS DENGUE	44
9.4 ALTA VIREMIA Y ANTIGENEMIA DURANTE LAS INFECCIONES PRIMARIAS POR DENGUE	46
9.5 LA VIREMIA, LA ANTIGENEMIA Y LA INFECCIÓN NATURAL DE MONOCITOS POR VIRUS DENGUE, NO SE ASOCIAN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA	47
10. DISCUSIÓN	49
11. CONCLUSIONES	52
12. RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFIA	54
ANEXOS	63



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables	32
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas de los pacientes con infección por virus dengue	42
<b>Tabla 3.</b> Correlación entre viremia, antigenemia e infección de monocitos con parámetros de laboratorio	48

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> La viremia y antigenemia se correlacionan durante las infecciones de dengue.	43
<b>Figura 2.</b> Los monocitos son la principal población infectada durante la infección natural por DENV.	44
<b>Figura 3.</b> Niveles más altos de viremia y antigenemia durante las infecciones primarias por DENV.	46
<b>Figura 4.</b> Niveles comparables de viremia, antigenemia y frecuencia de monocitos infectados en diferentes grados de severidad en la infección por DENV.	47

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A.</b> Instrumento.	64
<b>Anexo B.</b> Aprobación comité de ética.	65
<b>Anexo C.</b> qPCR	66
<b>Anexo D.</b> Eco TM System vs ABI 7300.	67
<b>Anexo E.</b> Infección de células Vero.	68
<b>Anexo F.</b> Expresión intracelular de NS1 de virus dengue en células mononucleares de sangre periférica de un niño infectado naturalmente.	69
<b>Anexo G.</b> Cronograma.	70
<b>Anexo H.</b> Presupuesto.	71
<b>Anexo I.</b> Prueba Piloto.	73

## RESUMEN DEL PROYECTO

**Antecedentes:** El dengue es uno de los principales problemas de salud pública en las regiones tropicales del mundo. Los factores virales e inmunológicos del huésped determinan el curso clínico de la infección.

**Objetivo:** Determinar si la magnitud de la viremia, antigenemia e infección de mononucleares circulantes son determinantes de la severidad clínica en la infección natural por DENV en niños del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila.

**Diseño del estudio:** La viremia (determinada por qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), antigenemia (determinación en suero de NS1 a través de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) y la infección de PBMC (por citometría de flujo) fueron evaluados en 59 niños con dengue, clasificando la enfermedad de leve a severa. Se realizó seguimiento clínico y de laboratorio diariamente durante todo el periodo de hospitalización.

**Resultados:** La viremia (DENV copias/mL) y la antigenemia (NS1) en plasma los niveles alcanzaron su punto máximo durante los primeros días de la enfermedad y se correlacionaron ( $\rho = 0,37$ ,  $p = 0,003$ ). Monocitos (CD14 + células) fueron las células infectadas más dentro de la población PBMC, con una cinética similar que la de la viremia y la antigenemia. Los niveles de viremia y la antigenemia fueron mayores en los niños con infecciones primarias que aquella con infecciones secundarias ( $P \leq 0.04$ ). No hubo asociaciones de los tres parámetros evaluados con la gravedad clínica.

**Conclusión:** La dinámica de la infección por virus dengue afecta en gran medida la evaluación de marcadores tanto virales como inmunológicos del huésped que permitan de manera clara prever el desenlace clínico de las personas infectadas en esta compleja enfermedad. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre los parámetros analizados y la severidad clínica.

**Palabras claves:** Dengue, severidad, dengue pediátrico, marcadores de severidad, NS1, antigenemia, viremia, células mononucleares de sangre periférica.

## ABSTRACT

**Background:** Dengue is a major public health problem in tropical regions of the world. The virus and immune host factors determine the clinical course of the infection

**Objective:** To explore the dynamics of viremia, antigenemia and infection of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and their association with clinical severity.

**Study design:** The viremia (by real time polymerase chain reaction), non-structural 1 protein antigenemia (by enzyme-linked immunosorbent assay) and infection of PBMCs (by flow cytometry) were evaluated in 59 children with dengue, ranged from mild to severe disease. Clinical and laboratory follow-up during whole hospitalization was daily realized.

**Results:** The viremia (DENV copies/mL) and antigenemia (plasma NS1) levels peaked during the early days of illness and were correlated ( $\rho=0.37$ ,  $P=0.003$ ). Monocytes (CD14<sup>+</sup> cells) were the most infected cells within the PBMCs population, with similar kinetics than that of viremia and antigenemia. The viremia and antigenemia levels were higher in children with primary infections than that with secondary infections ( $P\leq 0.04$ ). There were no associations of the three parameters evaluated with clinical severity.

**Conclusion:** The dynamic of dengue infection greatly affects the assessment of viral and host markers of clinical outcome in this complex disease.

**Keywords:** Dengue, viremia, antigenemia, monocytes, severity.

## INTRODUCCIÓN

El dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial. Es una enfermedad febril aguda, endémica en las regiones del trópico y subtrópico; una gran amenaza en salud pública dado que dos tercios de la población mundial se encuentran en riesgo de infección. (Screaton, Mongkolsapaya, Yacoub, & Roberts, 2015) Se estiman 390 millones de infecciones anuales, 100 millones de estas son sintomáticas, 500 000 casos de dengue grave y 25 000 casos fatales. En regiones endémicas es altamente necesaria la disponibilidad de métodos diagnósticos y marcadores que pronostiquen severidad (Bhatt et al., 2013).

La detección del genoma y de antígenos virales como la proteína no estructural 1 (NS1), son ampliamente usados para el diagnóstico temprano de la infección y en algunos estudios realizados en población asiática, se ha encontrado relación con la gravedad del cuadro clínico (Libraty, Young, et al., 2002), sin embargo, esto no ha sido notado en otros estudios (Kwissa et al., 2014). Se requieren investigaciones con mayor validez cuyos resultados puedan ser extrapolables a distintas poblaciones y sean consistentes para los distintos serotipos infectantes.

Por su parte, las células inmunes tisulares, son las células diana de la infección por virus dengue, y dada su accesibilidad, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) permitirían realizar una estimación indirecta de la magnitud de la infección inicial. (Screaton et al., 2015) Solo un trabajo en la literatura, ha descrito la baja frecuencia de esta infección (aproximadamente 2% de las CMSP); sin embargo, niños con choque, hemorragia u organopatías no han sido analizados.

Junto a la ausencia de un tratamiento específico, el alto número de casos de dengue severo es parcialmente debido a la falta de marcadores que sean eficientemente predictores de severidad. Estos tres parámetros (viremia, antigenemia y frecuencia de células mononucleares de sangre periférica naturalmente infectadas) han sido propuestos como marcadores de severidad en infección por dengue, sin embargo, los resultados experimentales son contradictorios. Se requieren investigaciones con mayor validez cuyos resultados puedan ser extrapolables a distintas poblaciones y sean consistentes para los distintos serotipos infectantes.

Por tanto, a través de ELISA, PCR y citometría de flujo, se determinó respectivamente, la magnitud de la antigenemia, viremia e infección de células mononucleares, y se estableció la asociación de cada uno de éstos parámetros con

las manifestaciones clínicas de los niños atendidos en el Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila. Se incluyeron 42 niños con dengue. 25 con dengue sin signos de alarma, 17 con dengue con signos de alarma y 17 con dengue severo. No hubo diferencias significativas entre los grupos en la frecuencia de infecciones primarias o secundarias. La antigenemia se encuentra francamente elevada durante los días iniciales de la enfermedad, y se correlaciona positivamente con los niveles de viremia. Ambos parámetros decaen al progresar la enfermedad. De manera característica, los niveles de viremia y antigenemia son mayores en infecciones primarias que en secundarias. Como se esperaba, los monocitos fueron la principal población afectada durante la infección natural por virus dengue.

Cada uno de los tres parámetros analizados presentó niveles comparables en diferentes grados de severidad de la infección por virus dengue, es decir, no se asociaron con severidad. Por otro lado, como evidenciamos, el curso dinámico de la infección por virus dengue, notoriamente afecta la evaluación de factores virales y del huésped determinantes del resultado clínico.

Éste trabajo está compuesto de catorce capítulos, comenzando desde la recopilación de antecedentes bibliográficos que permitieron la descripción, formulación del problema y su justificación, seguidos de los objetivos y el marco teórico, éste último conteniendo las definiciones y conceptos que se utilizaron en nuestra investigación; además, se presenta la hipótesis planteada.

Más adelante se eligieron las variables del estudio y se procedió a la operacionalización de éstas, planteándose posteriormente el diseño metodológico, el cual describe el tipo y ubicación del estudio, la población, muestra y muestreo, y las técnicas y procedimientos de recolección, tabulación y análisis de datos que se utilizaron; finalmente se detallan las consideraciones éticas que se tuvieron en cuenta para realizar nuestro estudio.

En el capítulo diez se presentan los resultados de la investigación, enfocándose en las características clínicas, paraclínicas y demográficas de los individuos, la caracterización de las CSA, y su asociación con la severidad de la enfermedad. Finalmente se presentan la discusión, conclusiones y recomendaciones que fueron fruto de la investigación, así como la bibliografía consultada y algunos anexos que se consideraron de vital importancia.

## 1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Aunque la mayoría de las infecciones por virus dengue resultan en una enfermedad febril autolimitada, el dengue es un problema de salud pública debido a que en algunos individuos evoluciona hacia formas severas que pueden ser fatales a menos que sean manejadas a tiempo. A pesar de la inmensa cantidad de estudios hechos hasta el momento, no se ha logrado definir con exactitud, qué factores tanto virales como del hospedero son determinantes para el desarrollo de severidad.

Varios factores inmunes como citocinas, han mostrado estar incrementados durante la infección con DENV y algunos de ellos se han asociado con cuadros clínicos más severos. Así, la respuesta inmune juega un crítico papel en la fisiopatología de la enfermedad. Varios mecanismos actúan en la inmunopatogénesis del dengue. La amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), basada en la presencia de anticuerpos (Acs) circulantes producidos en infecciones previas por un serotipo diferente al de la infección secundaria que no neutralizan al nuevo serotipo infectante, pero sí aumentan la infección de células blanco(Dejnirattisai et al., 2010):(S B Halstead, Porterfield, & O'Rourke, 1980). La elevada replicación viral conduce al aumento en la producción de proteínas de fase aguda, factores quimiotácticos, citocinas, activación del complemento y del sistema de coagulación, causando finalmente el aumento de la permeabilidad y las hemorragias características de ésta enfermedad(Scott B Halstead, 2007). Por otro lado hay producción de citocinas proinflamatorias por parte de clones de linfocitos T heterólogos. Varias de éstas, como IL-6, IL-8 y TNF-a se han asociado con formas severas de la enfermedad (Scott B Halstead, 2007):(Rothman, 2004). A pesar de analizar los factores inmunológicos, aún resulta controversial la situación cuando se intentan conocer los determinantes virales.

Las proteínas del DENV pueden identificarse por distintos métodos, principalmente por ELISA(Young, Hilditch, Bletchly, & Halloran, 2000). De ellas NS1 es la que más frecuentemente se usa como marcador temprano de infección (de la Cruz-Hernández et al., 2013), pues es detectable desde las primeras 48 a 72h de iniciados los síntomas(Alcon et al., 2002). Es una glicoproteína esencial para la replicación del virus y es altamente secretada por células infectadas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Alcon et al., 2002):(Flamand et al., 1999):(Muller et al., 2012).

Dado los hallazgos previos, que describían la detección de NS1 circulante en muestras de suero de fase aguda de pacientes con infecciones por virus dengue (VD), y posteriormente, su correlación positiva con la cantidad de virus infecciosos en cultivo



de células infectadas, Libraty et al., en 2002 desarrollaron un estudio para determinar si los niveles plasmáticos de sNS1 se correlacionaban con los niveles de viremia, si eran más altos en el dengue hemorrágico que en dengue clásico, y si los niveles sNS1 podrían identificar a los pacientes en riesgo de desarrollar dengue hemorrágico.

Utilizaron ELISA para cuantificar los niveles plasmáticos de (sNS1) y RT-PCR para la viremia, de manera diaria en 32 niños con infección por virus dengue 2. Los niños fueron seleccionados en la fase temprana de la enfermedad (primeras 72 horas luego de la aparición de la fiebre) y seguidos clínicamente registrando quienes desarrollaban severidad.

Los niveles de sNS1 en plasma se correlacionaron con los niveles de viremia y ambos fueron mayores en los pacientes con dengue hemorrágico que en aquellos con DF. Un nivel sNS1 libre elevado (>600 ng / ml) dentro de las 72 h del inicio de la enfermedad, identifica a los pacientes en riesgo de desarrollar dengue hemorrágico (Libraty, Young, et al., 2002).

La asociación entre la magnitud de la antigenemia (definida como NS1 en circulación) y la gravedad de las manifestaciones clínicas ha sido previamente explorada (Thomas et al., 2010); (Tricou, Minh, Farrar, Tran, & Simmons, 2011). En la mayoría de ellos, niveles más altos de NS1 circulantes se han asociado con formas clínicamente más graves de la enfermedad (Libraty, Young, et al., 2002) y ha sido sugerido como predictor temprano de severidad.

Se ha descrito un efecto directo de la carga viral en la presentación de manifestaciones hemorrágicas en modelos animales (Chen, Hofman, Kung, Lin, & Wu-Hsieh, 2007), además de que altos niveles de viremia y NS1 se correlacionan positivamente con parámetros bioquímicos como los niveles de aminotransferasas (enzimas hepáticas elevadas en dengue severo) (Erra et al., 2013), proponiéndose por lo tanto, que la viremia y antigenemia podrían ser determinantes en la gravedad del cuadro clínico.

A pesar de lo anterior, otros estudios, como el de Duong, V. *et al* (Duong et al., 2011a) utilizando un enfoque metodológico similar al anteriormente descrito (Libraty, Young, et al., 2002) encontraron en una población de 243 niños de Cambodia, que a pesar de la correlación positiva entre el nivel de NS1 y la viremia, una baja tasa de antígeno NS1 se asoció con enfermedad más severa, algo completamente contrario a lo descrito.

Los hallazgos no son entonces consistentes cuando se compara el tipo de infección (primaria o secundaria), el serotipo infectante o la población analizada (Tang et al., 2010) y no se sabe si esta posible asociación podría permitir el uso de los niveles de viremia y NS1 como predictores de formas severas de la enfermedad (Duong et al., 2011b).

In vitro, varias células primarias humanas han mostrado que soportan la replicación viral. En particular monocitos, macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas han demostrado ser permisivas a la infección (Durbin et al., 2008), (Ho et al., 2001), (Wu et al., 2000). A diferencia de los estudios in vitro, los trabajos que evalúan células primarias humanas blanco de la infección natural por DENV son escasos. Antígeno viral ha sido detectado por inmunohistoquímica en hepatocitos, miocardiocitos y células endoteliales de casos fatales de dengue (Doris Martha Salgado et al., 2010).

En solo un trabajo, se ha reportado la expresión intracelular de proteínas estructurales (PrM) y no estructurales (NS3) intracelulares en monocitos de pacientes infectados naturalmente con dengue. La co-expresión de las dos proteínas virales sugiere la activa replicación viral en monocitos bajo esas condiciones. Aunque con baja frecuencia de infección (aproximadamente 2% de las CMSP), niños con FDH tuvieron más alta frecuencia de monocitos infectados circulantes que niños con FD. Sin embargo, formas severas de la enfermedad como niños con choque, marcada hemorragia u organopatías no fueron analizados (Durbin et al., 2008). Así, las células blanco de la infección *in vivo* y la relación entre la infección de ellas y la gravedad de las manifestaciones clínicas es aún desconocida y su esclarecimiento podría ofrecer nuevos correlatos inmunes de severidad.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial debido a su elevada carga de morbilidad y mortalidad.

La infección comienza inmediatamente después de la inoculación del virus por el vector (mosquitos del género *Aedes*) a través de la piel, produciendo una primera replicación en las células tisulares (células dendríticas, monocitos y macrófagos locales), descritas como blanco de la infección. Después de 24 a 48h, estas células migran a ganglios linfáticos regionales, en donde ocurre una segunda y mayor replicación viral debido a la infección de un gran número de células del sistema monocito-macrófago. Posteriormente se produce la diseminación sistémica del virus, causando el pico de viremia característico de la fase temprana febril de la infección (primer a quinto día de inicio de la fiebre)(Rothman, 2004).

La infección por virus dengue se manifiesta en un rango de presentaciones clínicas. Una pequeña proporción de pacientes infectados desarrollan fuga plasmática severa que conduce a síndrome de shock por dengue, afección orgánica y sangrado. La infección ocurre con cualquiera de los cuatro serotipos existentes desarrollándose inmunidad específica frente al serotipo infectante, sin embargo, la infección subsecuente con un serotipo diferente incrementa el riesgo de desarrollar una enfermedad severa, lo que conduce a sugerir un fuerte papel inmunopatológico subyacente.

La viremia es definida como el número de copias de ARN por mililitro de sangre. A partir del segundo día de fiebre y hasta doce días después, ARN viral en circulación es detectable, con un pico entre el tercer y quinto día de iniciados los síntomas de la enfermedad (Gubler, Suharyono, Tan, Abidin, & Sie, 1981) . No se conoce claramente la relación del nivel de virus en sangre con respecto a factores del hospedero (infección primaria o secundaria, edad), ni con factores virales (por Ej. serotipo infectante).

Niveles elevados de viremia en infección secundaria por DENV2 han sido asociados con formas más graves de la enfermedad (Vaughn et al., 2000), sin embargo, en otros estudios esto no ha sido evidenciado(Duong et al., 2011a), dado que estos hallazgos varían dependiendo de la población analizada. Así, es controversial la asociación entre el serotipo infectante, el nivel de viremia, y la severidad clínica.

NS1, es una glicoproteína esencial para la replicación del virus y es altamente secretada por células infectadas, tanto *in vivo* como *in vitro*(Alcon et al., 2002)(Flamand et al., 1999)(Muller et al., 2012). Se utiliza como marcador diagnóstico, siendo detectable en plasma durante las primeras 48 a 72 horas. Su nivel sanguíneo se ha definido como antigenemia y previamente se ha explorado la relación de la magnitud de la antigenemia con la severidad clínica,(Libraty, Young, et al., 2002) y ha sido sugerido como predictor temprano de severidad.

Las células blanco de la infección por virus dengue son los macrófagos y las células dendríticas. Dada su accesibilidad, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (no tisulares) permitirían realizar una estimación indirecta de la magnitud de la infección inicial. Es escasa la bibliografía sobre el tema, pero estudios previos reportan la detección de proteínas virales intracelularmente en células mononucleares de sangre periférica, indicando infección. Sin embargo, no ha sido evaluada su relación con severidad clínica(Durbin et al., 2008).

Es usual considerar que la magnitud de la infección es un factor determinante en la severidad clínica con que ésta se presenta, sin embargo, la relación entre viremia-antigenemia, infección de CMSP y severidad en dengue es controversial. Es explícita la necesidad de profundizar en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y conocer los determinantes virológicos y del huésped determinantes de su curso y resultado clínico.

De lo anterior surge la siguiente pregunta de investigación

¿Cuál es la magnitud de la viremia, antigenemia y frecuencia de células mononucleares de sangre periférica infectadas por virus dengue, y su relación con la severidad clínica con que la infección se presenta en niños de 0 a 14 años de edad atendidos en el hospital Universitario de Neiva de enero a junio del 2015?

### 3. JUSTIFICACIÓN

En Colombia se presentaron en el 2014 110473 casos de dengue, el 2,5% de ellos fueron formas severas de la infección. El 41% (44 852/110 473) del total de casos de dengue y el 53,1 % (1 477/2 777) de casos de dengue grave se concentra en los menores de 14 años (INAS, 2014). Localmente, el Departamento del Huila es un área hiperendémica para el virus, con 1,231 casos severos (17.3%) del total nacional en las recientes epidemias entre los años 2010 y 2012 (INAS, 2012), justificándose y siendo casi mandatorio el investigar y profundizar en el conocimiento y análisis fisiopatológico de la enfermedad.

En regiones endémicas, como nuestro medio, es altamente necesaria la disponibilidad de métodos diagnósticos y marcadores que pronostiquen severidad. Se ha descrito un efecto directo de la carga viral en la presentación de manifestaciones hemorrágicas en modelos animales (Chen et al., 2007), además de que altos niveles de viremia y NS1 se correlacionan positivamente con parámetros bioquímicos como los niveles de aminotransferasas (enzimas hepáticas elevadas en dengue severo) (Erra et al., 2013), proponiéndose por lo tanto, que la viremia y antigenemia podrían ser determinantes en la gravedad del cuadro clínico. Varios estudios han demostrado la relación entre la viremia, NS1 y su contribución a la patogénesis del dengue (Hang et al., 2009) (Libraty, Young, et al., 2002) (Vaughn et al., 2000) (Wang et al., 2006), pero no son del todo consistentes los hallazgos cuando se compara el tipo de infección (primaria o secundaria), el serotipo infectante o la población analizada (Tang et al., 2010) y no se sabe si esta posible asociación podría permitir el uso de los niveles de viremia y NS1 como predictores de formas severas de la enfermedad (Duong et al., 2011b).

Las células blanco de la infección por virus dengue son los macrófagos y las células dendríticas. Es escasa la bibliografía sobre el tema, pero estudios previos reportan la detección de proteínas virales intracelularmente en células mononucleares de sangre periférica, indicando infección. Sin embargo, no ha sido evaluada su relación con severidad clínica. Así, las células blanco de la infección *in vivo* y la relación entre la infección de ellas y la gravedad de las manifestaciones clínicas es aún desconocida y su esclarecimiento podría ofrecer nuevos correlatos inmunes de severidad.

Aunque la mayoría de las infecciones por virus dengue resultan en una enfermedad febril autolimitada, el dengue es un problema de salud pública debido a que en

algunos individuos evoluciona hacia formas severas que pueden ser fatales a menos que sean manejadas a tiempo. La práctica actual es hospitalizar a los pacientes con signos tempranos de enfermedad (con signos de alarma) para la observación, y aunque efectiva, requiere de un aumento en los recursos de salud.

Si los determinantes tempranos de la severidad de la enfermedad por dengue fueran comprendidos en detalle, una atención más eficaz y menos costosa podría ser ideada. Es explícita la necesidad de desarrollar trabajos como el actual, para lograr fortalecer la capacidad tecnológica concerniente al análisis y diagnóstico de la infección por virus dengue, sus variaciones en presentación clínica según las características serológicas locales y para la generación de biomarcadores que pronostiquen severidad.

Con este trabajo se espera contribuir al desarrollo de nuevos marcadores predictores de severidad en dengue para la disminución de la alta carga de morbilidad y mortalidad de ésta enfermedad.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la magnitud de la viremia, antigenemia e infección de mononucleares circulantes son determinantes de la severidad clínica en la infección natural por DENV en niños del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el grado de viremia en niños con infección natural por virus dengue.

Establecer el nivel de antigenemia en niños infectados con DENV.

Definir la frecuencia de células mononucleares de sangre periférica infectadas naturalmente en niños con dengue.

Analizar la relación entre viremia, antigenemia y frecuencia de células mononucleares de sangre periférica infectadas con la severidad clínica.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DEL DENGUE Y SU INMUNOPATOGENESIS

El dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial debido a su elevada carga de morbilidad y mortalidad. Se estiman que 390 millones de infecciones ocurren anualmente en el mundo y debido a la localización del vector en áreas tropicales, más de 2.5 billones de personas están en riesgo de infectarse (Bhatt et al., 2013). En el último año en Colombia se presentaron 61,649 casos de dengue, el 3.3% de ellos fueron formas severas de la infección. Localmente, el Departamento del Huila es un área hiperendémica para el virus, con 1,231 casos severos (17.3%) del total nacional en las recientes epidemias entre los años 2010 y 2012 (INAS, 2012).

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, del que se conocen 4 serotipos (denominados DENV-1 al 4). Estos son virus envueltos, icosaedros, con un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y polaridad positiva. La envoltura viral está compuesta de fosfolípidos y contiene a las proteínas de envoltura (E) y de membrana (M). Después de la entrada a la célula hospedera, el ARN viral es traducido a una poliproteína, que luego de transportarse al retículo endoplásmico y aparato de Golgi, sufre modificaciones postraduccionales originando 3 proteínas estructurales (llamadas del core [C], de membrana [M] y de envoltura [E]) y 7 proteínas no estructurales (llamadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). De éstas últimas no se conoce totalmente su función, pero se ha descrito que por ejemplo que NS1, NS2A, NS4A y NS4B forman un complejo de replicación del ARN viral, NS2B y NS3 tienen función serina proteasa para el clivaje proteico del virus, y NS5 es una polimerasa dependiente de ARN (Rodenhuis-Zybert, Wilschut, & Smit, 2010). Adicionalmente, varias de ellas han sido implicadas en mecanismos de inmunoevasión, por ejemplo inhibiendo la vía de los Interferones tipo I. Para la liberación de la partícula viral se ensambla el core formado por la proteína C, se empaqueta el ARN y se liberan nuevas partículas infectantes luego de la fusión con la membrana de la célula huésped (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

La infección comienza inmediatamente después de la inoculación del virus por el vector (mosquitos del género *Aedes*) a través de la piel, produciendo una primera replicación en las células blancas (células dendríticas, monocitos y macrófagos + locales). Después de 24 a 48h, estas células migran a ganglios linfáticos regionales, en donde ocurre una segunda y mayor replicación viral debido a la



infección de un gran número de células del sistema monocito-macrófago. Posteriormente se produce la diseminación sistémica del virus, causando el pico de viremia característico de la fase temprana febril de la infección(Rothman, 2004).

Varios factores inmunes como citocinas, han mostrado estar incrementados durante la infección con DENV y algunos de ellos se han asociado con cuadros clínicos más severos. Así, la respuesta inmune juega un crítico papel en la fisiopatología de la enfermedad. Varios mecanismos actúan en la inmunopatogénesis del dengue. La amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), basada en la presencia de anticuerpos (Acs) circulantes producidos en infecciones previas por un serotipo diferente al de la infección secundaria que no neutralizan al nuevo serotipo infectante, pero sí aumentan la infección de células blanco(Dejnirattisai et al., 2010)(S B Halstead et al., 1980). La elevada replicación viral conduce al aumento en la producción de proteínas de fase aguda, factores quimiotácticos, citocinas, activación del complemento y del sistema de coagulación, causando finalmente el aumento de la permeabilidad y las hemorragias características de ésta enfermedad(Scott B Halstead, 2007). Por otro lado hay producción de citocinas proinflamatorias por parte de clones de linfocitos T heterólogos. Varias de éstas, como IL-6, IL-8 y TNF-a se han asociado con formas severas de la enfermedad(Scott B Halstead, 2007)(Rothman, 2004).

## 5.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN DENGUE

El diagnóstico de la enfermedad se basa en un componente clínico y de la confirmación por laboratorio. Clínicamente se utilizan los criterios revisados de la OMS 2009 incluidos en la guía integrada de manejo de dengue en Colombia 2010, clasificando la enfermedad en dengue sin signos de alarma, con signos de alarma y dengue grave, éste último abarcando manifestaciones hemorrágicas, choque o lesión de órgano blanco como corazón, cerebro o hígado(Pons-Estel, Alarcón, Scofield, Reinlib, & Cooper, 2010).

Para la confirmación de la infección en el laboratorio están disponibles varios métodos que pueden ser clasificados en directos (detección de proteínas virales, amplificación de su genoma o aislamiento viral) o indirectos (detección de Acs específicos para DENV)(Simmons, Farrar, Nguyen, & Wills, 2012). En los primeros 5 días de la enfermedad (fase febril), se deben utilizar los métodos directos, ya que es en éste periodo en que está presente el virus o sus componentes.

La reacción en cadena de polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) es la técnica más utilizada debido a su alta sensibilidad (Harris et al., 1998) (Lanciotti, Calisher, Gubler, Chang, & Vorndam, 1992) y facilidad de aplicación en comparación con el aislamiento viral, además del alto costo de éste último y la demora en los resultados (Osorio, Ramirez, Bonelo, Villar, & Parra, 2010). La RT-PCR se basa en la retro-transcripción del ARN viral a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) utilizando transcriptasas inversas, para posteriormente realizar la amplificación del segmento de interés gracias a ADN polimerasas dependientes de ADN (Bustin, 2000). La reacción puede llevarse a cabo en uno o dos pasos (la síntesis del ADNc y su amplificación se hacen en un mismo tubo, o por separado) y puede ser anidada o semianidada, es decir, primero se realiza la reacción con cebadores externos para amplificar una región de ADN extensa que contiene el segmento de interés, y después, éste producto se utiliza como molde para una segunda PCR con uno (semianidada) o dos (anidada) cebadores internos para amplificar la región específica (Bustin, 2000).

Una variación de ésta, es la PCR en tiempo real (qPCR), que tiene como característica fundamental la posibilidad de determinar además del serotipo, el número de copias de ARN viral/unidad de volumen (viremia, si la muestra es sangre o un derivado) (Wong & Medrano, 2005). En la qPCR se introducen moléculas fluorescentes que se unen a los ácidos nucleicos y permiten detectar la amplificación del segmento de interés, al tiempo en que van ocurriendo los ciclos de la reacción, calculando finalmente la cantidad relativa (veces de incremento en la amplificación del gen de interés en comparación con la de un gen de concentración conocida) o absoluta (determinación a través de una curva estándar generada por la dilución seriada de un control positivo) del genoma viral (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996). Se ha propuesto que la qPCR tiene ventajas sobre la PCR convencional, como por ejemplo el ser más sensible que ésta (Gurukumar et al., 2009).

Existen diversos protocolos de detección, serotipificación y cuantificación de DENV por qPCR. Su diferencia se basa principalmente en la química fluorescente utilizada, si se utilizan reacciones en uno o dos pasos o si se detectan uno o más serotipos al mismo tiempo (qPCR en formato multiplex). Las moléculas fluorescentes de detección de la amplificación más frecuentemente utilizados son los intercaladores de ADN de cadena doble, como SYBR Green (Chien et al., 2006) (Dos Santos et al., 2008) y las sondas de hidrólisis fluorescentes, como Taqman (Gurukumar et al., 2009) (Laue, Emmerich, & Schmitz, 1999) (Sadon et al., 2008). Los primeros, emiten

fluorescencia cuando se unen a ADN de cadena doble, mientras que los segundos lo hacen cuando la molécula de detección se separa de otra que inhibe su fluorescencia (Wong & Medrano, 2005). En el caso de las reacciones en uno o dos pasos, se prefieren los primeros porque se minimiza la probabilidad de contaminación de la muestra y la variación entre las reacciones enzimáticas (De Paula, de Melo Lima, Torres, Pereira, & Lopes da Fonseca, 2004);(Mishra, Sharma, Pujhari, Appannanavar, & Ratho, 2011). La mayoría de éstos emplean sondas de hidrólisis tipo Taqman (Callahan et al., 2001);(Ito et al., 2004).

Otro de los métodos directos para el diagnóstico de dengue, es la detección de la proteína NS1 viral a través del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), siendo de gran ayuda en lugares donde no se disponen de las técnicas descritas previamente. Se ha reportado una especificidad entre el 86 al 100%, con una sensibilidad variable, pues es mayor al 90% en infecciones primarias y del 60 al 80% en secundarias(Erra et al., 2013); éstos valores varían también entre los estuches comerciales disponibles (Osorio et al., 2010).

Los métodos indirectos de diagnóstico de la enfermedad comprenden la detección de inmunoglobulinas (Igs) específicas para DENV por ELISA, que se deben realizar después del cuarto día de iniciada la fiebre. La seroconversión de Ig M o G entre dos muestras pareadas es confirmatoria para una infección. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas es similar a las de detección de NS1, por lo que en general se combinan para un diagnóstico más preciso de la enfermedad(Blacksell et al., 2012).

### 5.3 VIREMIA Y ANTIGENEMIA EN DENGUE

Aunque se ha descrito la aparición de intensa viremia durante los primeros días de iniciado los síntomas de dengue, no se conoce claramente su relación con factores virales o del hospedero, que son determinantes para la magnitud de la misma, como por ejemplo el serotipo infectante, el tipo de infección (primaria o secundaria), o su relación con el patrón de citocinas, elementos que en conjunto podrían contribuir al desarrollo de formas severas de la enfermedad(Libraty, Young, et al., 2002). A partir del segundo día de fiebre y hasta doce días después, ARN viral en circulación es detectable, con un pico entre el tercer y quinto día (Duyen et al., 2011)(Gubler et al., 1981) , alcanzando valores incluso entre de  $10^7$  -  $10^9$  copias de ARN por mililitro de sangre(Duyen et al., 2011)(Tricou et al., 2011). Aunque se ha visto una mayor carga

viral en infecciones por DENV-1(Duyen et al., 2011) y menores en infecciones por DENV-4(Gubler et al., 1981), no hay una clara asociación entre el serotipo infectante y el nivel de viremia y paradójicamente, ésta es mayor en infecciones primarias que en secundarias(Duyen et al., 2011)(Guilarde et al., 2008). Sin embargo, estos hallazgos varían dependiendo de la población analizada y alta viremia en infección secundaria por DENV2 ha sido asociada también con formas más graves de la enfermedad (Vaughn et al., 2000). Así, la asociación entre viremia, serotipo y severidad continúa siendo aún controversial.

Las proteínas del DENV pueden identificarse por distintos métodos, principalmente por ELISA(Young et al., 2000). De ellas NS1 es la que más frecuentemente se usa como marcador temprano de infección (de la Cruz-Hernández et al., 2013), pues es detectable desde las primeras 48 a 72h de iniciados los síntomas(Alcon et al., 2002). Es una glicoproteína esencial para la replicación del virus y es altamente secretada por células infectadas, tanto *in vivo* como *in vitro*(Alcon et al., 2002)(Flamand et al., 1999)(Muller et al., 2012).

La asociación entre la magnitud de la antigenemia (definida como NS1 en circulación) y la gravedad de las manifestaciones clínicas ha sido previamente explorada (Thomas et al., 2010)(Tricou et al., 2011). En la mayoría de ellos, niveles más altos de NS1 circulantes se han asociado con formas clínicamente más severas de la enfermedad (Libraty, Young, et al., 2002) y ha sido sugerido como predictor temprano de severidad.

Se ha descrito un efecto directo de la carga viral en la presentación de manifestaciones hemorrágicas en modelos animales(Chen et al., 2007), además de que altos niveles de viremia y NS1 se correlacionan positivamente con parámetros bioquímicos como los niveles de aminotransferasas (enzimas hepáticas elevadas en dengue severo) (Erra et al., 2013), proponiéndose por lo tanto, que la viremia y antigenemia podrían ser determinantes en la gravedad del cuadro clínico. Varios estudios han demostrado la relación entre la viremia, NS1 y su contribución a la patogénesis del dengue (Hang et al., 2009)(Libraty, Young, et al., 2002)(Vaughn et al., 2000)(Wang et al., 2006), pero no son del todo consistentes los hallazgos cuando se compara el tipo de infección (primaria o secundaria), el serotipo infectante o la población analizada (Tang et al., 2010) y no se sabe si esta posible asociación podría permitir el uso de los niveles de viremia y NS1 como predictores de formas severas de la enfermedad (Duong et al., 2011b).

## 5.4 INFECCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS HUMANAS POR VIRUS DENGUE

*In vitro*, varias células primarias humanas han mostrado que soportan la replicación viral. En particular monocitos, macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas han demostrado ser permisivas a la infección (Durbin et al., 2008)(Ho et al., 2001)(Wu et al., 2000). Generalmente, en éstas células la infección con DENV induce el aumento de la expresión de marcadores de activación celular como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, CD80, CD86 entre otras. De hecho, se ha sugerido una relación entre la expresión en superficie de algunos marcadores de activación en PBMC de niños con dengue y la condición clínica de éstos(Durbin et al., 2008)(Green et al., 1999). A diferencia de los anteriores tipos celulares, linfocitos T y linfocitos B han mostrado ser resistentes a la infección (Kou et al., 2008), incluso en presencia de concentraciones óptimas de anticuerpos heterólogos subneutralizantes(Blackley et al., 2007).

A diferencia de los estudios *in vitro*, los trabajos que evalúan células primarias humanas blanco de la infección natural por DENV son escasos. Antígeno viral ha sido detectado por inmunohistoquímica en hepatocitos, miocardiocitos y células endoteliales de casos fatales de dengue(Doris Martha Salgado et al., 2010).

La detección de genoma o proteínas virales en CMSP naturalmente infectadas es niños tiene pocos precedente. Ácido ribonucleico viral fue detectado en Monocitos y linfocitos B circulantes obtenidos de pacientes infectados naturalmente con DENV(Srikiatkachorn et al., 2012). Sin embargo, ARN de polaridad negativa, forma intermediaria del ciclo viral y marcador de replicación activa fue muy bajo o indetectable y no se encontró diferencia en pacientes con fiebre dengue o formas más clínicamente severas.

En solo un trabajo, se ha reportado la expresión intracelular de proteínas estructurales (PrM) y no estructurales (NS3) intracelulares en monocitos de pacientes infectados naturalmente con dengue. La co-expresión de las dos proteínas virales sugiere la activa replicación viral en monocitos bajo esas condiciones. Aunque con baja frecuencia de infección (aproximadamente 2% de las CMSP), niños con FDH tuvieron más alta frecuencia de monocitos infectados circulantes que niños con FD. Sin embargo, formas severas de la enfermedad como niños con choque, marcada hemorragia u organopatías no fueron analizados(Durbin et al., 2008). Así, las células blanco de la infección *in vivo* y la relación entre la

infección de ellas y la gravedad de las manifestaciones clínicas es aún desconocida y su esclarecimiento podría ofrecer nuevos correlatos inmunes de severidad.

Debido a que el dengue es una enfermedad de alto impacto en nuestra región, es crítico contar con marcadores que permitan detectar tempranamente a los pacientes pediátricos con mayor riesgo de desarrollar formas graves o complicaciones. Aquí se propone determinar las asociaciones de la viremia, antigenemia y la frecuencia de CMSP infectadas con las manifestaciones clínicas y gravedad de la enfermedad.

## 6. HIPÓTESIS

- a. Los niños con dengue grave, presentan mayor nivel de viremia con respecto a niños que no desarrollan severidad.
- b. La cantidad de NS1 en sangre (antigenemia) es mayor en niños con dengue grave, que en los niños sin severidad.
- c. Existe diferencia entre la frecuencia de células mononucleares de sangre periférica infectadas naturalmente en niños con dengue grave, grupo en el cual es mayor, con respecto a los pacientes que no desarrollan severidad.
- d. La viremia, antigenemia y magnitud de la infección de mononucleares circulantes son determinantes de la gravedad clínica en la infección natural por DENV en niños

## 7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla 1.** Operacionalización de variables

Variable	Definición	Subvariables	Indicadores o categorías	Nivel de medición
Características socio-demográficas	Características socio-demográficas presentes en la población sujeta a estudio	-Edad  -Genero	- Edad en meses  -Masculino o femenino	-Razón  -Nominal
Viremia	Es la fase de la enfermedad donde el virus se encuentra en el torrente sanguíneo. En dengue la fase de viremia es desde el primer día de síntomas hasta el quinto día siendo el pico máximo el tercer día.	viremia	Número de copias de RNA viral por mililitro de sangre	Razón
Antigenemia	Cantidad de antígeno de virus dengue en sangre.	Antigenemia	Titulo limite detectable	Razón
Infección de células mononucleares de sangre periférica	Detección de proteína no estructural NS1 intracelular en células mononucleares de sangre periférica con énfasis en linfocitos B y monocitos que sugiere replicación viral activa.	Infección de células mononucleares de sangre periférica.	Número de mononucleares con expresión intracelular de NS1	Razón
Severidad clínica	Grado de compromiso clínico de los pacientes infectados por virus dengue.	Dengue con signos de alarma  Dengue sin signos de alarma  Dengue grave	Si/No	Nominal



## 8. DISEÑO METODOLÓGICO

### 8.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio observacional (ya que no se manipularon las variables), longitudinal (que se desarrolló a lo largo de un periodo de tiempo definido), prospectivo (se tomaron casos que ingresaron en el periodo especificado [enero a julio de 2014], con análisis de casos y controles (los sujetos fueron seleccionados en función de que tuvieran [casos] o no [controles] la enfermedad).

### 8.2 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, en conjunto con el servicio de pediatría del Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila, centro de tercer nivel de atención y referencia para la zona sur de Colombia.

### 8.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

**8.3.1 Población.** Muestras de sangre de niños entre 1 y 14 años con diagnóstico clínico de dengue y una evolución de 3 a 7 días desde el inicio de la fiebre que acudieron al Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, Huila en el periodo de enero a septiembre de 2014 (80 pacientes).

**8.3.2 Muestra y muestreo.** Se seleccionó una muestra no representativa usando los criterios clínicos revisados de la OMS 2010:

- a. Caso probable de dengue: Todo paciente que presente una enfermedad febril aguda de hasta siete días, de origen no aparente, acompañada de 2 o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, postración, exantema, y que además tenga antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que resida en un área endémica de dengue.

- b. Caso probable de Dengue con Signos de alarma: Paciente que cumple con la anterior definición y además presenta cualquiera de los siguientes signos de alarma: Dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, diarrea, somnolencia y/o irritabilidad, hipotensión postural, hepatomegalia dolorosa >2cms, disminución de la diuresis, caída de la temperatura, hemorragias en mucosas, caída abrupta de plaquetas (<100.000) asociada a hemoconcentración.
- c. Caso probable de Dengue grave: Cumple con cualquiera de las manifestaciones graves de dengue que se mencionan a continuación: 1) Extravasación severa de plasma que conduce a síndrome de choque por dengue o acumulo de líquidos con dificultad respiratoria. 2) Hemorragias severas 3) Daño grave de órganos como miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas >1.000), colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos.
- d. Caso confirmado de dengue: Caso probable de dengue o dengue grave confirmado por alguno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico (pruebas serológica IgM dengue o pruebas virológicas como aislamiento viral o RT- PCR).

Los niños fueron distribuidos en los siguientes grupos: 1) niños sanos, 2) niños con dengue sin signos de alarma, 3) niños con dengue y signos de alarma y 4) niños con dengue severo. Cada grupo contará con 20 individuos. Los niños tuvieron una edad de entre 1 a 14 años y una evolución de 3 a 7 días desde el inicio de la fiebre (fase aguda).

#### 8.4 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron técnicas de investigación de campo y laboratorio, realizando mediciones biofisiológicas in vitro de muestras de sangre de los individuos. Además, se emplearon técnicas de investigación documental, mediante la revisión de la historia clínica de cada individuo.

## 8.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Previo consentimiento informado firmado por los acudientes, a cada uno de los niños se les tomó dos muestras de sangre (2mL en cada toma) en fase aguda, separadas por un día, denominadas aguda temprana (3-5 día) y aguda tardía (6-8 día). El diagnóstico de infección por DENV y la clasificación de la enfermedad se harán usando los criterios clínicos revisados de la OMS 2009 presentes en la guía integrada de manejo de dengue en Colombia 2010. El diagnóstico se confirmará por la presencia de IgM específica de DENV y/o NS1 en plasma por ELISA. Cada muestra de sangre venosa se recolectará en tubos con EDTA; los tubos se centrifugarán inmediatamente a  $300 \times g$  y el plasma se conservará a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para detección de inmunoglobulinas M y G específicas (a realizarse en la muestra aguda tardía) y NS1 de DENV plasmática y para la tipificación y cuantificación por RT-PCR en tiempo real (a realizarse en la muestra aguda temprana) como se explicará adelante.

**8.5.1 ELISA para la detección de inmunoglobulinas específicas de DENV y la proteína viral NS1 en plasma.** Para la detección de IgM e IgG específicas de DENV, se emplearán los estuches comerciales Dengue IgM capture Elisa (Ref: E-DEN01M) y Dengue IgG capture Elisa (Ref: E-DEN02G), respectivamente, los dos de Panbio (Alere, Australia), siguiendo todas las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la detección de las Igs,  $100\mu\text{L}$  de las muestras, controles y calibrador diluidos 1/100 en el diluyente proveído por el estuche, serán añadidos a la placa cubierta con anticuerpo anti-IgM o IgG humanas. Luego de una hora de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , se lavará la placa y se añadirán  $100\mu\text{L}$  del antígeno viral previamente mezclado con el anticuerpo anti-dengue acoplado a peroxidasa. Se incubará nuevamente por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego de un lavado, se revelará con  $100\mu\text{L}$  de tetrametilbenzidina (TMB) y se detendrá la reacción con  $100\mu\text{L}$  de ácido fosfórico 1M. La lectura se realizará a 450 nm (referencia 600-650 nm) en un equipo Thermo (Thermo Instruments, USA). El resultado será reportado como negativo o positivo. Para determinar primo infección o infección subsecuente, una relación de  $\text{IgM/IgG} \geq 2$  o  $< 2$  en muestra tomada en la fase aguda tardía será clasificada como infección primaria e infección secundaria, respectivamente, como previamente ha sido reportado (Hatch Steven, 2011). Aunque no es un objetivo específico en esta propuesta debido a que se espera que del 80-90% de los casos de dengue incluidos serán infecciones secundarias, en una parte del análisis se compararán los factores aquí evaluados entre los pocos niños con primo infección y los niños con infección subsecuente.

**8.5.2 Evaluación semicuantitativa de la antigenemia en niños con dengue.** La cantidad relativa de NS1 circulante, será evaluada mediante diluciones seriadas de plasma usando el estuche comercial Early (REF E-DEN02P) de Panbio. Cien  $\mu\text{L}$  de las muestras, controles y calibrador diluidos al medio serán añadidos a la placa cubierta con el anticuerpo anti-NS1. Luego de una hora de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  la placa se lavará y se añadirán  $100\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-NS1 acoplado a peroxidasa. Se incubará nuevamente la placa por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego de otro lavado, se revelará y se leerá como se describió previamente. De cada muestra se realizarán diluciones seriadas hasta alcanzar el “cutt off” generado por el control negativo del ensayo y el nivel de ruido de fondo generado por la inclusión de plasma de voluntarios sanos. La cantidad relativa de NS1 en plasma será reportado como título límite detectable. Cada dilución será realizada por duplicado y sólo se aceptarán ensayos que tengan en las muestras un efecto dosis con un coeficiente de determinación significativo  $>0.9$  y una variabilidad entre duplicados  $<10\%$ .

**8.5.3 Aislamiento del ARN para la RT-PCR y qPCR.** Para la obtención del ARN viral se utilizará el estuche comercial QIAmp viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, Cat: 52906), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante. Brevemente,  $140\mu\text{L}$  de las muestras de plasma serán mezclados con buffer AVL y “carrier” de ARN e incubados a temperatura ambiente por 10 min. Luego se añadirán  $560\mu\text{L}$  de etanol al  $100\%$  y tras 2 pasos de centrifugación a  $6000\text{ xg}$  por un min, se pasarán  $1,260\mu\text{L}$  de la solución total por la columna correspondiente. Posteriormente se realizarán 2 lavados con  $500\mu\text{L}$  de buffer AW1 y AW2 y se hará la elución con  $40\mu\text{L}$  de buffer AVE. La concentración de ARN aislado será determinada usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo, Wilmington, USA) disponible en el Laboratorio de I&I.

**8.5.4 Evaluación de la carga viral en plasma por qPCR.** Para la tipificación y cuantificación absoluta de las partículas de DENV circulantes en plasma, se emplearán los estuches comerciales para detección de DENV-1 a 4, provenientes de Shanghai ZJ Bio-Tech Co (Cat: ER-0063-04), que emplea para la detección una sonda fluorescente tipo Taqman. Brevemente,  $9\mu\text{L}$  de Súper Mix,  $0.5\mu\text{L}$  del mix enzimático y  $0.5\mu\text{L}$  del control interno (para detectar la inhibición de la qPCR) fueron mezclados con  $2.5\mu\text{L}$  del control positivo (cuatro diluciones seriadas  $1:10$ , iniciando en  $1 \times 10^7$  copias/ml), control negativo (agua libre de nucleasas) y del ARN purificado como se describió previamente. El perfil térmico que se empleará es:  $45^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, 1 ciclo;  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, 1 ciclo;  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, 40 ciclos; la fluorescencia será medida a  $60^{\circ}\text{C}$ .

El ensayo se llevará a cabo usando el equipo de qPCR Eco™ System (Illumina, San Diego, CA), disponible en el Lab I&I de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana. Los datos serán analizados con el software proveído por el equipo (EcoStudy software versión 5.0). La sensibilidad y el límite de cuantificación del ensayo son  $1 \times 10^3$  copias/ml y  $2 \times 10^3$ - $1 \times 10^8$  copias/ml, respectivamente. Se tomará como “cut off” un Cq 37 ciclos. Nuestra capacidad de serotipificar y cuantificar la carga viral en lisado celular y plasma de niños con dengue naturalmente infectados es mostrada en el anexo III y IV y reportada en un trabajo actualmente en revisión (Perdomo F y col. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS DENGUE 2 EN LISADO CELULAR Y PLASMA DE NIÑOS POR PCR EN TIEMPO REAL USANDO UN ESTUCHE COMERCIAL Y EL EQUIPO ECOTM SYSTEM-ILLUMINA. En revisión, 2014).

Como controles positivos, adicional se empleará lisado celular infectado con cada uno de los virus a analizar, amplificados en cultivo de células VERO-76 (adquiridas desde el ATCC, Número: CRL-1587D). 500µL de sobrenadante de cultivo con cada serotipo viral (amablemente proveídos por Iván Darío Vélez, Universidad de Antioquia, Colombia) serán añadidos a una monocapa de células VERO-76 con un 70% de confluencia. Éstas se incubarán en medio DMEM 1X y SFB al 2% (ambos de GIBCO, Carlsbad, Estados Unidos; Cat: 11965-126 y 16000-044, respectivamente) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al 5 día de cultivo se verificará la aparición de efecto citopático sobre la monocapa por microscopía óptica invertida y posteriormente el sobrenadante de los cultivos se recolectará y congelará a -70°C hasta su uso. Como control se recolectará el sobrenadante de cultivo celular no infectado tratado de forma idéntica a la ya descrita (Mock). La pureza del serotipo de DENV infectante será determinada por RT-PCR convencional.

**8.5.5 Criopreservación y descongelación de CMSP.** La criopreservación y descongelación de las CMSP se ha realizado como previamente se reportó . De notar este protocolo ha sido extensamente validado y muy frecuentemente usado . Para la criopreservación las CMSP fueron lavadas con medio completo, resuspendidas y contadas. Posteriormente CMSP fueron lentamente resuspendidas en SFB que contenía 10% de dimetil-sulfóxido ([DMSO, ATCC, E.U. Cat: 4-X], medio de congelación), previamente enfriado a 4°C, a una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/mL y depositadas en crioviales de polipropileno (Nunc, Thermo, E.U. Cat: 375418), para ser pasadas rápidamente a -70°C en contenedores de poliestireno que aseguraban un lento descenso en la temperatura. Luego de 24h,

los crioviales fueron transferidos a tanque de nitrógeno líquido (Thermo, E.U. Cat: CY509106) y permanecerán allí hasta el momento de su análisis. Para su descongelación, las CMSP serán retiradas del nitrógeno líquido e incubadas en baño serológico precalentado a 37°C; una vez descongeladas, las células serán transferidas a tubos de 15mL de poliestireno (Falcon – BD, E.U. Cat: 352099) que contenga 10mL de medio completo frío para retirar el DMSO. Finalmente las células serán lavadas una vez más con medio completo.

**8.5.6 Detección de células mononucleares de sangre periférica infectadas naturalmente con DENV.** Una vez descongeladas como se describió previamente, un millón de CMSP serán lavadas en dos ocasiones con RPMI 1640 suplementado con SFB 10%, Penicilina 100U/mL – Estreptomicina 100mg/mL, L-glutamina (2mM), todos adquiridos desde GIBCO (Medio completo). Las células serán fijadas con 300uL de citofix (BD, San Jose, USA) por 20 min a 4°C y lavadas posteriormente en dos ocasiones con 700uL de Perm-Wash (BD, San Jose, USA). El pellet celular será resuspendido y se le adicionarán respectivamente 10uL de FcR blocking (Miltenyi Biotek, Alemania, orden 130-059-901) y 20uL de suero humano heterólogo y se incubará por 10min cada uno a temperatura ambiente (para el bloqueo de los FcγR y disminución de uniones inespecíficas). Transcurrido el tiempo, se añadirá una apropiada cantidad de anti-NS1 (9NS1), anticuerpo monoclonal hecho en ratón, que reconoce la NS1 de los 4 serotipos de DENV proveído por Irene Bosch (MIT, Mass, USA) quien aporta la colaboración internacional de esta propuesta. Las células serán incubadas por 30 min a 4°C y posteriormente lavadas con Perm-Wash. El pellet será resuspendido y se agregará un anticuerpo anti-ratón hecho en cabra, acoplado a APC (Molecular Probes, Eugene, OR) y se incubará por 30 min a 4°C. Después de lavado con Perm-wash y debido a que clásicamente los monocitos han sido descritos como blanco de infección in vitro, un anti CD14 PerCP Cy5.5 será adicionado para determinar el % de éstas células que soportan replicación viral activa. El CD19, para identificar linfocitos B también será adicionado. En una fracción de experimentos un anticuerpo anti-PrM hecho en ratón (proporcionado también por I. Bosch, MIT, Mass, USA), y un anticuerpo anti-DENV (Merck, Darmstadt, Cat: MAB10217, clon D3-2H2-9-21) serán adicionados en simultánea con el anti-NS1. Todos los experimentos de infección natural de CMSP serán adquiridos en un FACS Canto II, que cuenta con 3 Laser y 8 parámetros de fluorescencia.

**8.5.7 Seguimiento clínico y paraclínico de los niños incluidos.** Para la recolección de datos se emplearon las historias clínicas de los pacientes. Todo el diagnóstico, seguimiento, manejo clínico y clasificación de la severidad de la enfermedad causada por la infección con virus dengue se hizo de acuerdo a los criterios y recomendaciones dadas por la OMS.

## 8.6 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Durante toda la hospitalización se llevó un estricto seguimiento clínico diario. El examen médico general tuvo énfasis en signos asociados con la aparición de complicaciones por virus dengue (fragilidad capilar, ventilación, dolor abdominal entre otros). Niños con diagnóstico de dengue sin signos de alarma fueron captados y manejados en el primer nivel de atención en la zona urbana de Neiva. A estos niños se les realizó un seguimiento clínico y paraclínico diario en busca de signos de alarma. A niños hospitalizados que presentaron formas severas de la enfermedad, se les llevó un formato escrito previamente diseñado y reportado por nuestro grupo en previas publicaciones (Doris Martha Salgado et al., 2010) (Doris M Salgado, Panqueba, Castro, R Vega, & Rodríguez, 2009) el cual contiene parámetros clínicos y paraclínicos. Este formato fue diligenciado diariamente, durante todo el tiempo de la hospitalización del niño, por miembros del Departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva. De igual manera, todos los datos fueron registrados en el instrumento de recolección de datos **(ver anexo I)** Para el análisis de las muestras en el laboratorio:

- a. La cantidad relativa de NS1 circulante, será evaluada mediante diluciones seriadas de plasma usando el estuche comercial Early (REF E-DEN02P) de Panbio.
- b. Para la obtención del ARN viral se utilizará el estuche comercial QIAmp viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, Cat: 52906), siguiendo todas las recomendaciones del fabricante.
- c. Para la detección de IgM e IgG específicas de DENV, se emplearán los estuches comerciales Dengue IgM capture Elisa (Ref: E-DEN01M) y Dengue IgG capture Elisa (Ref: E-DEN02G), respectivamente, los dos de Panbio (Alere, Australia), siguiendo todas las instrucciones del fabricante.
- d. . Todos los experimentos de infección natural de CMSP serán adquiridos en un FACS Canto II, que cuenta con 3 Laser y 8 parámetros de fluorescencia.

## 8.7 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se hará con el software GraphPad Prism 5.0. Los resultados serán mostrados en forma de mediana y rango. Se usarán pruebas estadísticas no paramétricas. Para el análisis de dos grupos independientes se utilizará la prueba de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon para el análisis de datos pareados; para analizar más de dos grupos independientes, se usará la prueba de Kruskal-Wallis. El grado de correlación entre dos variables será determinado con el coeficiente de correlación de Spearman. En todos los casos se tomará como significativo un valor de  $p < 0.05$ . Para propósitos estadísticos, a las muestras con número no detectable de copias de ARN viral se les asignará un valor arbitrario de 500 copias/MI (la mitad del límite de sensibilidad del ensayo).

## 8.8 ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación se realizó considerando las disposiciones de la resolución 8430 de 1993, la cual establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Según el artículo 11 de la misma ésta investigación fue clasificada como de riesgo mínimo. Todos los voluntarios y/o sus acudientes firmaron el consentimiento informado. Se mantuvo la confidencialidad y anonimato de cada individuo.

Éste trabajo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo **(ver anexo II)**.



## 9. RESULTADOS

### 9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE NIÑOS CON DENGUE

A continuación se analizaron 42 niños con dengue (25 con dengue sin signos de alarma [DNS], 17 con signos de alarma [DWS]) y 17 niños con dengue grave (SD). Como se muestra en la Tabla 1, no hubo diferencias en la edad y el día de la enfermedad entre los dos grupos de pacientes ( $P \geq 0.1$ , prueba de Mann-Whitney).

Todos los niños con SD tenían IgM específica para DENV detectable, con una diferencia significativa en comparación con los niños con dengue ( $p = 0,02$ , prueba de Mann-Whitney). No hubo diferencias en la frecuencia de las infecciones primarias y secundarias en ambos grupos ( $p = 0,2$ , prueba de Mann-Whitney) y pacientes con infecciones primarias estaban en menor día de la enfermedad que aquellos con infecciones secundarias cuando ingresaron al estudio ( $p = 0,01$ ; prueba de Mann-Whitney, datos no presentados).

La frecuencia de pacientes con NS1 detectable en plasma fue similar entre los niños con dengue y SD ( $P = 0,5$ , test de Fisher). Los serotipos más frecuentemente identificados fueron DENV-3 y DENV-1 (Tabla 1). Como era de esperar, los niños con SD tenían menores recuentos de plaquetas, niveles de alanina aminotransferasa más altos y tiempos de coagulación más prolongados que los niños con dengue ( $p \leq 0.001$ , prueba de Mann-Whitney). De los 17 niños con SD, 13 (76%) presentaron fugas masivas de plasma, 4 (24%) tenían miocarditis, 2 (12%) tuvieron encefalitis, uno tenía hepatitis y uno tenía una lesión renal aguda (6%, respectivamente).

Es de destacar que cuando se compararon DNS, DWS y SD, los niños con DNS tuvieron un menor día de enfermedad ( $p < 0,0001$ , prueba post-hoc de Dunn), mayor frecuencia de infecciones primarias y mayor tasa de detección de NS1 en plasma que los niños con DWS y SD ( $P > 0,02$ , test de Fisher, datos no presentados).

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con infección por virus dengue

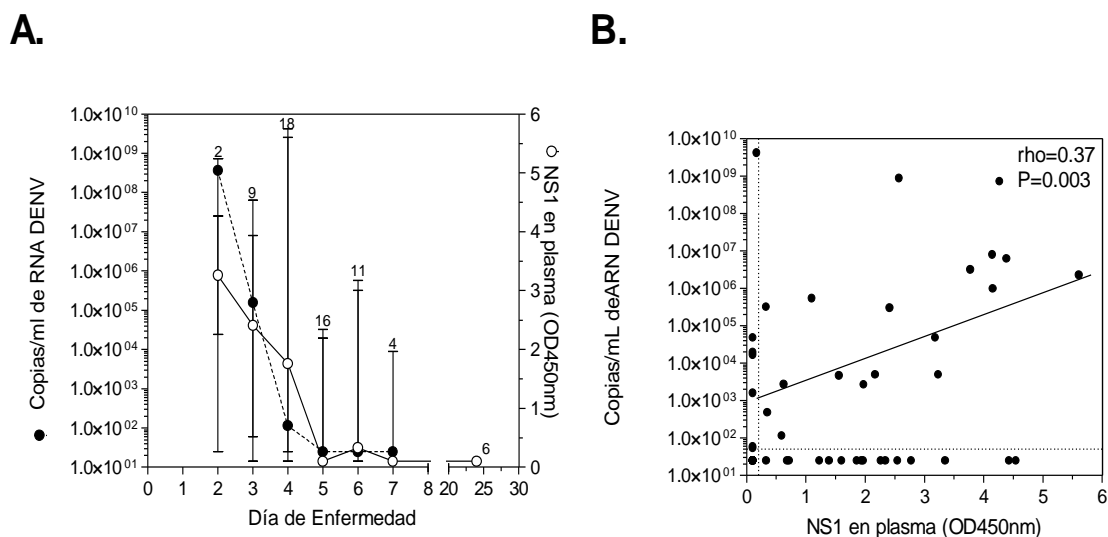
	Dengue (n=42)	Dengue severo(n=17)	Valor P
<b>Edad, Meses, Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	48 (1-168)	16 (4-144)	0.2
<b>Día de enfermedad, Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	4 (2-7)	5 (4-7)	0.1
<b>IgM<sup>+</sup> específica para DENV, n (%)<sup>2</sup></b>	32 (76)	17 (100)	0.02
<b>IgG<sup>+</sup> específica para DENV, n (%)<sup>2</sup></b>	15 (35.7)	9 (53)	0.1
<b>Infección primaria, n (%)<sup>2</sup></b>	27 (64.3)	8 (47)	0.2
<b>Infección secundaria, n (%)<sup>2</sup></b>	15 (35.7)	9 (53)	0.2
<b>NS1<sup>+</sup>, n (%)<sup>2</sup></b>	26 (70)	12 (70.5)	0.5
<b>DENV-1<sup>+</sup>, n (%)<sup>2</sup></b>	14 (33.3)	2 (12)	0.1
<b>DENV-2<sup>+</sup>, n (%)<sup>2</sup></b>	2 (14.2)	4 (23.5)	0.07
<b>DENV-3<sup>+</sup>, n (%)<sup>2</sup></b>	12 (28.5)	6 (35)	0.7
<b>DENV-4<sup>+</sup>, n (%)<sup>2</sup></b>	0 (0)	0 (0)	1
<b>Indeterminado, n (%)<sup>2</sup></b>	10 (24)	5 (29.5)	0.4
<b>Leucocitos, células x 1000/<math>\mu</math>L; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	5.42 (2.3-20.3)	8 (2.4-13.9)	0.3
<b>Hemoglobina, g/dL; Mediana(rango)<sup>1</sup></b>	12.3 (10-15.2)	12.6 (9.6-18.9)	0.9
<b>Hematocrito, %; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	37 (31.6-43)	37 (27.4-53.5)	0.8
<b>Plaquetas, células x 1000/<math>\mu</math>L; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	153 (41-248)	51 (21-128)	<0.0001
<b>Alanina aminotransferasa, IU/L; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	96.5 (37-277.6)	296.8 (67-659)	0.008
<b>Aspartato aminotransferasa, IU/L; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	59.1 (30-118)	151 (41-392)	0.6
<b>Tiempo de Protrombina, segundos; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	11.2 (10-13.4)	14 (10.9-21.4)	0.001
<b>Tiempo parcial de tromboplastina, segundos; Mediana (rango)<sup>1</sup></b>	31.7 (27.8-43.5)	42 (29.1-64)	0.07

<sup>1</sup>Test de Mann-Whitney; <sup>2</sup> Test de Fisher.

## 9.2 ELEVACIÓN TEMPRANA DE LA VIREMIA Y LA ANTIGENEMIA DURANTE LA INFECCIÓN DEL DENGUE

Como se muestra en la Figura 1A, se encontraron altos niveles de ARN de DENV y NS1 en plasma en el segundo día de la enfermedad (después de la aparición de fiebre) y luego disminuyeron a lo largo del tercer y cuarto día, con niveles indetectables en la mayoría de las muestras después del quinto día. Por consiguiente, los niveles de viremia y antigenemia fueron mayores en los días iniciales que en los finales de la enfermedad ( $\leq 4$  vs.  $> 4$  días, prueba  $P \leq 0.0002$ , Mann-Whitney, datos no mostrados). Los niveles de viremia y antigenemia están débilmente correlacionados en los casos de dengue ( $\rho = 0,37$ ,  $p = 0,003$ , prueba de Spearman, Figura 1B), sin embargo, esta observación es principalmente explicada por las infecciones primarias y su menor día de la enfermedad ( $\rho = 0,41$  y  $0,13$ ;  $P = 0,01$  y  $0,5$ ; infecciones primarias y secundarias, respectivamente; datos no mostrados).

**Figura 1.** La viremia y antigenemia se correlacionan durante las infecciones de dengue.



A. Las copias/ml de DENV (puntos blancos) y los niveles plasmáticos de NS1 (DO450nm a una dilución 1/200; puntos abiertos) fueron determinados por qPCR y ELISA, respectivamente. Se muestran la mediana y el rango de ambos parámetros en cada día de enfermedad. El número de pacientes analizados se muestra en la parte superior. B. Correlación entre las copias / ml de niveles DENV y NS1 en todos

los pacientes analizados. El valor rho y P del test de Spearman se muestra en la parte superior.

### 9.3 LOS MONOCITOS FUERON LAS PRINCIPALES CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS DENGUE

Al igual que en los hallazgos de la viremia y la antigenemia, un pico temprano (segundo día de la enfermedad) de PBMCs positivas para detección intracelular de proteína M (PreM<sup>+</sup>) se observó. Dicha positividad fue evidenciable hasta el sexto y el séptimo día de la enfermedad (datos no mostrados). Las células CD14<sup>+</sup> constituyeron el 91% (rango 77 a 100) de PBMCs PreM<sup>+</sup>, seguido por las células CD14-CD19- (7%, rango de 0 a 20) y células CD19<sup>+</sup> (2%, rango 0-7) (datos no mostrados). Usando la estrategia “gating” presentada en la Figura 2A, se determinó la frecuencia de monocitos y células B (CD14<sup>+</sup> y células CD19<sup>+</sup>, respectivamente) infectados por DENV en la fase aguda y de convalecencia de la enfermedad. Como se muestra en la Figura 2B y C, una mayor frecuencia e intensidad media de fluorescencia (MFI) de células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> fue obtenida durante la infección aguda por dengue en comparación con la fase de convalecencia ( $P = 0,0001$ , prueba de Mann-Whitney), con células CD19<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> indetectables. ( $P \geq 0,1$ , prueba de Mann-Whitney).

**Figura 2.** Los monocitos son la principal población infectada durante la infección natural por DENV.

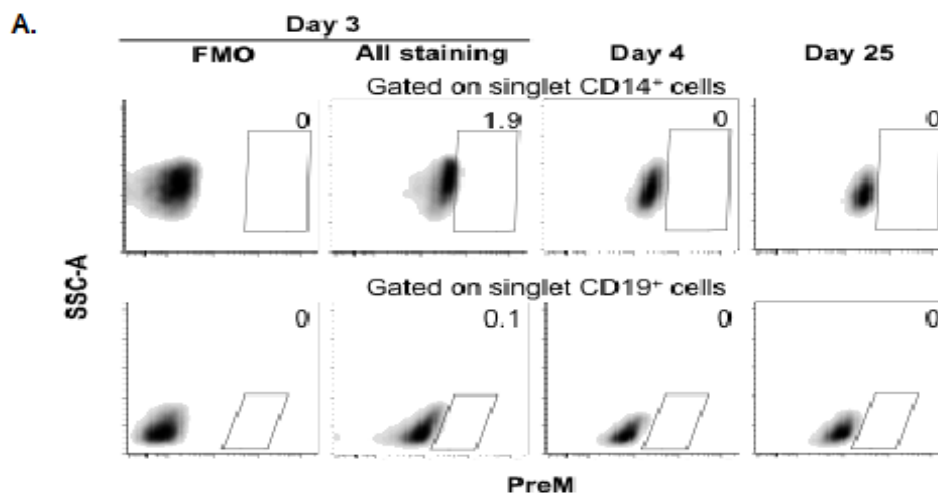
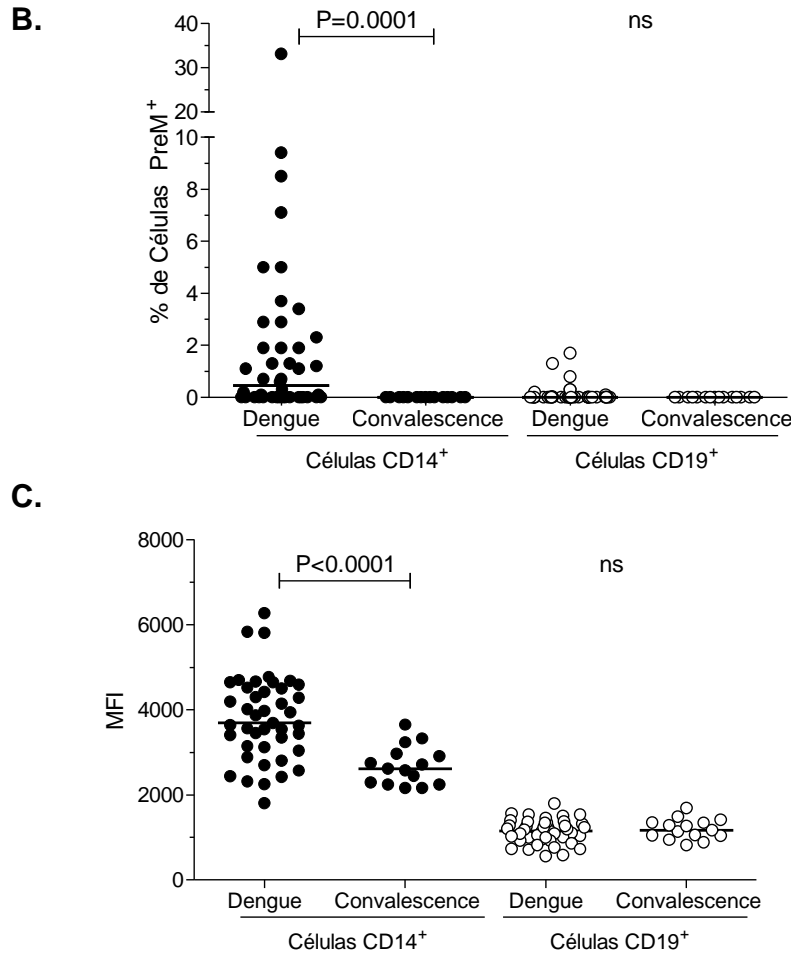


Figura 2. (Continuación)

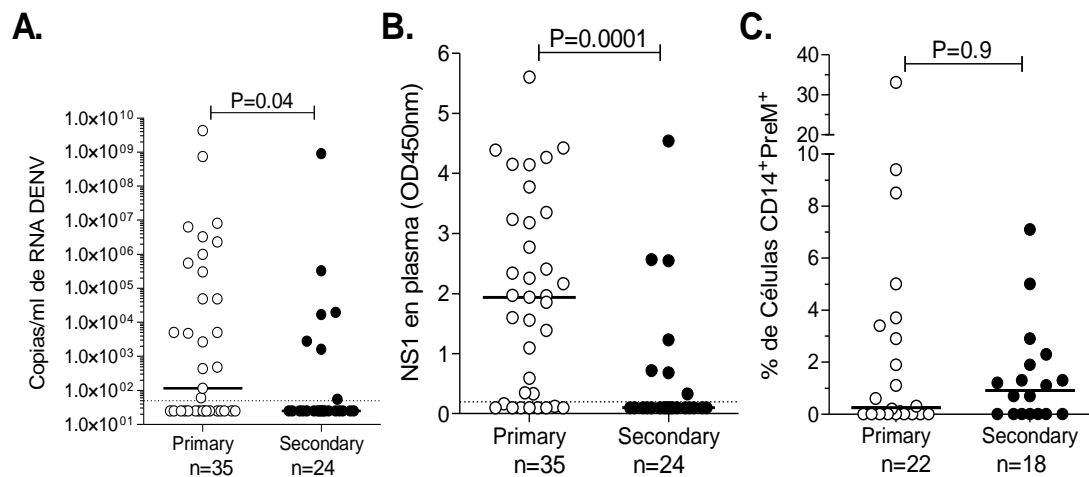


A. Estrategia de “gating” para el análisis de las poblaciones de CD14 + y CD19 + infectados naturalmente con DENV (células PreM<sup>+</sup>). Un paciente durante el tercer, cuarto y 25 día de la enfermedad es presentado (uno de los dos experimentos). FMO: Fluorescencia menos un control. **B-C.** Resumen del % de células CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> (**B**) y la intensidad media de fluorescencia (MFI) en el total de células CD14<sup>+</sup> + y células CD19 + (**C**) en niños en fases aguda (n = 44) y en convalecencia (n = 15). Se presenta la mediana y el valor P de la prueba de Mann-Whitney.

## 9.4 ALTA VIREMIA Y ANTIGENEMIA DURANTE LAS INFECCIONES PRIMARIAS POR DENGUE

La viremia, antigenemia y la frecuencia de células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> se compararon entre las infecciones primarias y secundarias, encontrándose mayores niveles de copias/ml de ARN de DENV y NS1 en plasma en pacientes con infecciones primarias que aquellos con infecciones secundarias ( $P \leq 0.04$ , prueba de Mann-Whitney, Figura 3A y B). No hubo diferencias en la frecuencia de células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> ( $P = 0,9$ , prueba de Mann-Whitney, Figura 3C).

**Figura 3.** Niveles más altos de viremia y antigenemia durante las infecciones primarias por DENV.

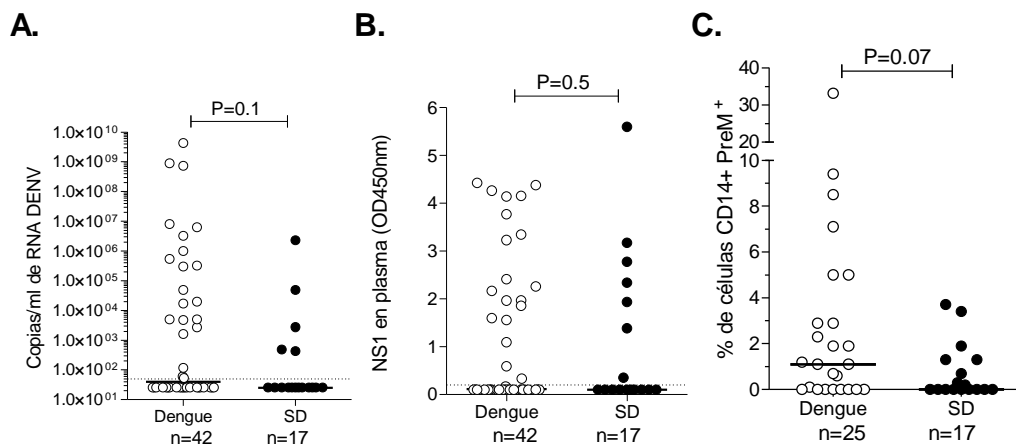


Las copias / ml de DENV (**A**), los niveles de NS1 en plasma (DO450nm a dilución 1/200) (**B**) y el % de células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> (**C**) se compararon entre las infecciones primarias y secundarias. Se presenta la mediana y el valor P de la prueba de Mann-Whitney. Las líneas de puntos en A y B indican el límite de detección de copias/ml de DENV y NS1 en plasma, respectivamente. El número de pacientes analizados en cada grupo se muestra a continuación.

## 9.5 LA VIREMIA, LA ANTIGENEMIA Y LA INFECCIÓN NATURAL DE MONOCITOS POR VIRUS DENGUE, NO SE ASOCIAN CON LA SEVERIDAD CLÍNICA

Para explorar la asociación de los tres parámetros virológicos con la severidad clínica en la infección por dengue, se compararon las copias/ml de ARN de DENV, NS1 en plasma y la frecuencia de las células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> entre los pacientes con dengue (DNS + DWS) y SD. Como se muestra en la Figura 4, no hubo diferencias entre ambos grupos en ninguno de los parámetros analizados ( $P \geq 0.07$ , prueba de Mann-Whitney), lo que indica una falta de asociación con la severidad clínica.

**Figura 4.** Niveles comparables de viremia, antigenemia y frecuencia de monocitos infectados en diferentes grados de severidad en la infección por DENV.



Las copias /ml de ARN de DENV **(A)**, los niveles de NS1 en plasma (DO450nm a dilución 1/200) **(B)** y el% de células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> **(C)** se compararon entre pacientes con dengue (DNS + DWS) y dengue grave (SD). Se presenta la mediana y el valor P de la prueba de Mann-Whitney. Las líneas de puntos en A y B indican el límite de detección de copias /ml de ARN de DENV y NS1 en plasma, respectivamente. El número de pacientes analizados en cada grupo se muestra a continuación.

Adicionalmente, se compararon los niveles de copias/ml de ARN de DENV, NS1 en plasma y la frecuencia de las células CD14<sup>+</sup> PreM<sup>+</sup> con los parámetros de laboratorio como el recuento de leucocitos y plaquetas, los niveles de aminotransferasas y los tiempos de coagulación (Tabla 2). Sólo se encontró una correlación positiva entre el tiempo parcial de tromboplastina y niveles de NS1 plasmáticas ( $\rho = 0,47$ ,  $p =$

0,01, test de Spearman, Tabla 2) y una correlación negativa entre la protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina con la frecuencia de células CD14<sup>+</sup> PreM (rho = -0.47 y -0.5; p = 0,01 y 0,007, respectivamente, test de Spearman, Tabla 2). Por lo tanto, aunque no se asociaron con la severidad clínica del dengue, los niveles plasmáticos NS1 podrían estar asociados con trastornos de la coagulación en el dengue.

**Tabla 3.** Correlación entre viremia, antigenemia e infección de monocitos con parámetros de laboratorio

Parámetro	copias/mL de RNA de DENV	NS1 en plasma (OD450nm)	% de células CD14 <sup>+</sup> PreM+
	rho (Valor P)	rho (Valor P)	rho ( valor P)
Leucocitos	-0.05 (0.7)	-0.23 (0.1)	0.1 (0.2)
Hematocrito	-0.05 (0.7)	-0.09 (0.6)	-0.1 (0.9)
Plaquetas	0.2 (0.09)	0.31 (0.06)	0.1 (0.2)
Alanina aminotransferasa	-0.03 (0.8)	0.13 (0.4)	-0.3 (0.06)
Aspartato aminotransferasa	0.1 (0.5)	0.22 (0.2)	-0.3 (0.05)
Tiempo de protrombina	-0.09 (0.6)	0.25 (0.2)	<b>-0.47 (0.01)</b>
Tiempo parcial de tromboplastina	-0.08 (0.6)	<b>0.47 (0.01)</b>	<b>-0.5 (0.007)</b>

Rho y valor de P del test de Spearman son mostrados



## 10. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, se determinó la magnitud de la viremia, antigenemia y la infección natural de PBMCs en un grupo de niños con dengue. La tasa de detección de ARN de DENV en plasma (74,5%) fue similar a la previamente descrita (Fox et al., 2011) con la circulación de tres de los cuatro serotipos en el período del estudio. Elevados títulos de NS1 en plasma fueron hallados en niños con dengue, con un pico temprano muy similar al del ARN de DENV (Figura 1A y la Figura 1A). La cinética de la viremia y la antigenemia es acorde a reportes anteriores, con los más altos niveles entre el segundo y el cuarto día de la enfermedad y volviéndose casi indetectable después del quinto día (Duyen et al., 2011). Ambos parámetros se correlacionan débilmente y de manera positiva (Figura 1B), con una mejor correlación en las infecciones primarias también explicado por el menor día de la enfermedad y la mayor tasa de detección en este grupo de pacientes.

El virus Dengue tiene tropismo por varios tipos de células humanas primarias y el estudio de la infección natural de PBMCs podría vislumbrar la magnitud de la infección tisular y ser utilizado como un método de diagnóstico (Chunhakan, Butthep, Yoksan, Tangnararatchakit, & Chuansumrit, 2009). Aquí se evaluó la frecuencia de monocitos y células B infectados por DENV (Figura 2), dos poblaciones que son infectadas después de la infección natural e *in vitro* (Durbin et al., 2008)(King et al., 1999). Evidenciamos la infección a través de la detección intracelular de la proteína viral estructural preM, lo que es indicativo de la infección viral y / o la replicación (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Dentro de las PBMCs preM+, los monocitos (células CD14+) fueron la principal población, seguido por las células CD14-CD19- y células B (células CD19+), respectivamente. Aunque no fue evaluado, las células CD14-CD19- preM+ que aquí se encuentran son probablemente células dendríticas, otra diana importante del DENV (Ho et al., 2001). Al parecer, el DENV no infecta a las células T o células NK (Kou et al., 2008). Es de destacar que la frecuencia de monocitos infectados por DENV fue baja (figura 2B), indicando que probablemente la mayor parte de las células infectadas se encuentra en los órganos linfoides secundario o en los tejidos periféricos como la piel (Neves-Souza et al., 2005)(Balsitis et al., 2009). Similar a reportes previos (Neves-Souza et al., 2005), la frecuencia de PBMCs infectados por DENV fue equiparable tanto en la fase temprana como en la tardía de la enfermedad (datos no mostrados), a diferencia de los niveles de viremia y antigenemia. Esta observación indica que el virus continúa infectando las células en la fase tardía de la enfermedad, pero no logra llevar a cabo un ciclo viral completo (no se refleja en

los niveles de viremia y/o antigenemia). En una pequeña fracción de los monocitos circulantes, la proteína preM detectada a nivel intracelular podría ser un antígeno de DENV fagocitado y no un indicador de infección/replicación viral (Durbin et al., 2008).

Según la teoría de la amplificación dependiente de anticuerpos, durante las infecciones secundarias se esperaba tender una carga viral más alta (Rothman, 2011). Sin embargo, al igual que en reportes previos (de la Cruz-Hernández et al., 2013), aquí hemos encontrado mayores niveles de viremia y antigenemia en las infecciones primarias (Figura 3), que podrían ser explicadas por: I. La presencia de complejos anticuerpos-NS1 circulantes en infecciones secundarias que no permiten la detección de la proteína (Koraka et al., 2003) II. El temprano y rápido aclaramiento viral en infecciones secundarias (datos no mostrados y (Tricou et al., 2011)); III. El mayor porcentaje de niños con DNS en el grupo de infecciones primarias (son incluidos en el estudio al inicio de la sintomatología, marco clínico que coincide con los picos de detección de virus y antígeno en sangre). Por lo tanto, según nuestros hallazgos y descripciones previas, la viremia y la antigenemia son modificados de manera dinámica cuando son analizados según el día de la enfermedad y el estado inmunitario del individuo.

No se encontró una asociación entre viremia, antigenemia e infección natural de monocitos con la severidad clínica (Figura 4). Uno de los principales factores que modifican esta asociación es el día de la enfermedad en el que se evalúan estos parámetros (debido a su pico en la fase aguda), ya que los estudios que encontraron una asociación con la severidad, evaluaron los niveles de NS1 en las primeras 72 horas de inicio de los síntomas (Libraty, Young, et al., 2002)(Libraty, Endy, et al., 2002). Los virus circulantes disminuyen durante la fase tardía de la enfermedad (cuando la mayoría de las manifestaciones graves surgen) indicando que la patología del dengue es mediada principalmente por la respuesta inmune (Screaton et al., 2015), por lo que no podría ser un factor determinante de la severidad. Al examinar la posible asociación entre los parámetros virológicos y de laboratorio, hemos encontrado una correlación entre los niveles de antigenemia y la frecuencia de los monocitos infectados con el PT y PTT, respectivamente (Tabla 2). NS1 se puede unir a protrombina e inhibir su activación, por lo que podría ser un mecanismo de hemorragia inducida por DENV(Lin et al., 2012). In vitro, el DENV induce la secreción del inhibidor del activador del plasminógeno por los monocitos, estimulando una actividad pro-coagulante(Krishnamurti & Alving, n.d.). Durante la infección por DENV, la pérdida masiva de plaquetas, añadido a la producción

alterada de factores de coagulación por el compromiso hepático y el efecto NS1 en protrombina, induce un ambiente anticoagulante y fibrinolítico que excede la actividad pro-coagulante de los monocitos, dando como resultado el sangrado. Sin embargo, el papel de los monocitos en la regulación del sistema de coagulación durante la infección por virus dengue debe ser explorado.

## 11. CONCLUSIONES

Se encontraron niveles elevados de viremia durante la infección natural por virus dengue en fases temprana de la enfermedad. Su valor fue mayor en infecciones primarias que en secundarias.

Por su parte, la antigenemia presentó una cinética similar a la viremia con un pico en los primeros días de la enfermedad y un decline en días posteriores. Hallamos altos niveles de antigenemia durante la infección natural por virus dengue en estadios tempranos de la enfermedad. Similar a la viremia, su valor fue mayor en infecciones primarias que en secundarias.

La frecuencia de PBMCs infectados por DENV fue baja y equiparable tanto en la fase temprana como en la tardía de la enfermedad. Los monocitos fueron la principal población de PBMCs infectados naturalmente por virus dengue.

Los niveles de viremia, antigenemia y la frecuencia de células mononucleares de sangre periférica son comparables entre los niños con dengue no severo y dengue severo. Por tanto, no existió asociación alguna de estos parámetros con la severidad clínica.

## **12.RECOMENDACIONES**

La infección por virus dengue se caracteriza por presentar un curso y una evolución dinámica, resultante de la interacción constante entre factores virales, del huésped y del ambiente. Es precisamente ésta característica de la infección que refleja la compleja labor de búsqueda de marcadores que pronostiquen severidad.

Al evaluar distintos parámetros inmunológicos y virológicos como la antigenemia y la viremia, es necesario analizar los resultados según el día de la enfermedad, el estatus inmunológico del individuo y la clasificación clínica en el momento de la evaluación.

## BIBLIOGRAFÍA

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 376–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825945>

Balsitis, S. J., Coloma, J., Castro, G., Alava, A., Flores, D., McKerrow, J. H., ... Harris, E. (2009). Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *80*(3), 416–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270292>

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504–7. <http://doi.org/10.1038/nature12060>

Blackley, S., Kou, Z., Chen, H., Quinn, M., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., ... Jin, X. (2007). Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *Journal of Virology*, *81*(24), 13325–34. <http://doi.org/10.1128/JVI.01568-07>

Blacksell, S. D., Jarman, R. G., Gibbons, R. V, Tanganuchitcharnchai, A., Mammen, M. P., Nisalak, A., ... Lalloo, D. G. (2012). Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, *19*(5), 804–10. <http://doi.org/10.1128/CVI.05717-11>

Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, *25*(2), 169–193. <http://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>

Callahan, J. D., Wu, S. J., Dion-Schultz, A., Mangold, B. E., Peruski, L. F., Watts, D. M., ... Temenak, J. J. (2001). Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4119–24. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001>

Chen, H.-C., Hofman, F. M., Kung, J. T., Lin, Y.-D., & Wu-Hsieh, B. A. (2007). Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *Journal of Virology*, 81(11), 5518–26. <http://doi.org/10.1128/JVI.02575-06>

Chien, L.-J., Liao, T.-L., Shu, P.-Y., Huang, J.-H., Gubler, D. J., & Chang, G.-J. J. (2006). Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1295–304. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>

Chunhakan, S., Butthep, P., Yoksan, S., Tangnararatchakit, K., & Chuansumrit, A. (2009). Early diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue viral antigen in peripheral blood mononuclear cell. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(12), 1085–8. <http://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181acf6a3>

De la Cruz-Hernández, S. I., Flores-Aguilar, H., González-Mateos, S., López-Martínez, I., Alpuche-Aranda, C., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2013). Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), 446–54. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0023>

De Paula, S. O., de Melo Lima, C., Torres, M. P., Pereira, M. R. G., & Lopes da Fonseca, B. A. (2004). One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 30(4), 297–301. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.11.004>

Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5979), 745–8. <http://doi.org/10.1126/science.1185181>

Dos Santos, H. W. G., Poloni, T. R. R. S., Souza, K. P., Muller, V. D. M., Tremeschin,

F., Nali, L. C., ... Aquino, V. H. (2008). A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology*, 80(8), 1426–33. <http://doi.org/10.1002/jmv.21203>

Duong, V., Ly, S., Lorn Try, P., Tuiskunen, A., Ong, S., Chroeung, N., ... Buchy, P. (2011a). Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1244. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001244>

Duong, V., Ly, S., Lorn Try, P., Tuiskunen, A., Ong, S., Chroeung, N., ... Buchy, P. (2011b). Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1244. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001244>

Durbin, A. P., Vargas, M. J., Wanionek, K., Hammond, S. N., Gordon, A., Rocha, C., ... Harris, E. (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*, 376(2), 429–35. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.028>

Duyen, H. T. L., Ngoc, T. V, Ha, D. T., Hang, V. T. T., Kieu, N. T. T., Young, P. R., ... Wills, B. A. (2011). Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(9), 1292–300. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir014>

Erra, E. O., Korhonen, E. M., Voutilainen, L., Huhtamo, E., Vapalahti, O., Kantele, A., ... Falk, K. (2013). Dengue in Travelers: Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia and Their Associations with Clinical Parameters. *PLoS ONE*, 8(6), e65900. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0065900>

Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, 73(7), 6104–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364366>



Fox, A., Le, N. M. H., Simmons, C. P., Wolbers, M., Wertheim, H. F. L., Pham, T. K., ... Nguyen, V. K. (2011). Immunological and viral determinants of dengue severity in hospitalized adults in Ha Noi, Viet Nam. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e967. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000967>

Green, S., Pichyangkul, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., ... Ennis, F. A. (1999). Early CD69 Expression on Peripheral Blood Lymphocytes from Children with Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(5), 1429–1435. <http://doi.org/10.1086/315072>

Gubler, D. J., Suharyono, W., Tan, R., Abidin, M., & Sie, A. (1981). Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bulletin of the World Health Organization*, 59(4), 623–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6976230>

Guilarde, A. O., Turchi, M. D., Siqueira, J. B., Feres, V. C. R., Rocha, B., Levi, J. E., ... Martelli, C. M. T. (2008). Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(6), 817–24. <http://doi.org/10.1086/528805>

Gurukumar, K. R., Priyadarshini, D., Patil, J. A., Bhagat, A., Singh, A., Shah, P. S., & Cecilia, D. (2009). Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal*, 6, 10. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-10>

Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet (London, England)*, 370(9599), 1644–52. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)

Halstead, S. B., Porterfield, J. S., & O'Rourke, E. J. (1980). Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(4), 638–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6157332>

Hang, V. T., Nguyet, N. M., Trung, D. T., Tricou, V., Yoksan, S., Dung, N. M., ... Simmons, C. P. (2009). Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(1), e360. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000360>

Harris, E., Roberts, T. G., Smith, L., Selle, J., Kramer, L. D., Valle, S., ... Balmaseda, A. (1998). Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2634–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705406>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8908518>

Ho, L. J., Wang, J. J., Shaio, M. F., Kao, C. L., Chang, D. M., Han, S. W., & Lai, J. H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(3), 1499–506. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160189>

Ito, M., Takasaki, T., Yamada, K.-I., Nerome, R., Tajima, S., & Kurane, I. (2004). Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5935–7. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5935-5937.2004>

King, A. D., Nisalak, A., Kalayanrooj, S., Myint, K. S., Pattanapanyasat, K., Nimmannitya, S., & Innis, B. L. (1999). B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 30(4), 718–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928366>

Koraka, P., Burghoorn-Maas, C. P., Falconar, A., Setiati, T. E., Djamiatun, K., Groen, J., & Osterhaus, A. D. M. E. (2003). Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4154–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958240>

Kou, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W. W. S. I., Rose, R. C., Schlesinger, J. J., & Jin, X. (2008). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medical Virology*, 80(1), 134–46. <http://doi.org/10.1002/jmv.21051>

Krishnamurti, C., & Alving, B. (n.d.). Effect of dengue virus on procoagulant and fibrinolytic activities of monocytes. *Reviews of Infectious Diseases*, 11 Suppl 4, S843–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501855>

Kwissa, M., Nakaya, H. I., Onlamoon, N., Wrarmert, J., Villinger, F., Perng, G. C., ... Pulendran, B. (2014). Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host & Microbe*, 16(1), 115–27. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.001>

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(3), 545–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>

Laue, T., Emmerich, P., & Schmitz, H. (1999). Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2543–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405398>

Libraty, D. H., Endy, T. P., Houg, H.-S. H., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., ... Rothman, A. L. (2002). Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(9), 1213–21. <http://doi.org/10.1086/340365>

Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., ... Rothman, A. L. (2002). High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(8), 1165–1168. <http://doi.org/10.1086/343813>

Lin, S.-W., Chuang, Y.-C., Lin, Y.-S., Lei, H.-Y., Liu, H.-S., & Yeh, T.-M. (2012). Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *The Journal of Infection*, 64(3), 325–34. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.11.023>

Mishra, B., Sharma, M., Pujhari, S. K., Appannanavar, S. B., & Ratho, R. K. (2011). Clinical applicability of single-tube multiplex reverse-transcriptase PCR in dengue virus diagnosis and serotyping. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25(2), 76–8. <http://doi.org/10.1002/jcla.20434>

Muller, D. A., Landsberg, M. J., Bletchly, C., Rothnagel, R., Waddington, L., Hankamer, B., & Young, P. R. (2012). Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 4), 771–9. <http://doi.org/10.1099/vir.0.039321-0>

Neves-Souza, P. C., Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Valls-de-Souza, R., Reis, S. R., Cerqueira, D. I., ... Osterhaus, A. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infectious Diseases*, 5(1), 64. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-5-64>

Osorio, L., Ramirez, M., Bonelo, A., Villar, L. A., & Parra, B. (2010). Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology Journal*, 7, 361. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-7-361>

Pons-Estel, G. J., Alarcón, G. S., Scofield, L., Reinlib, L., & Cooper, G. S. (2010). Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 39(4), 257–68. <http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.10.007>

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(16), 2773–86. <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>

Rothman, A. L. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(7), 946–51. <http://doi.org/10.1172/JCI21512>

Rothman, A. L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews. Immunology*, 11(8), 532–43. <http://doi.org/10.1038/nri3014>

Sadon, N., Delers, A., Jarman, R. G., Klungthong, C., Nisalak, A., Gibbons, R. V., & Vassilev, V. (2008). A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *Journal of Virological Methods*, 153(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.023>

Salgado, D. M., Eltit, J. M., Mansfield, K., Panqueba, C., Castro, D., Vega, M. R., ... Bosch, I. (2010). Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(3), 238–42. <http://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181bc3c5b>

Salgado, D. M., Panqueba, C. A., Castro, D., R Vega, M., & Rodríguez, J. A. (2009). [Myocarditis in children affected by dengue hemorrhagic fever in a teaching hospital in Colombia]. *Revista de Salud Pública (Bogotá, Colombia)*, 11(4), 591–600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169215>

Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews. Immunology*, 15(12), 745–59. <http://doi.org/10.1038/nri3916>

Simmons, C. P., Farrar, J. J., Nguyen, van V. C., & Wills, B. (2012). Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366(15), 1423–32. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1110265>

Srikiatkachorn, A., Wichit, S., Gibbons, R. V, Green, S., Libraty, D. H., Endy, T. P., ... Rothman, A. L. (2012). Dengue viral RNA levels in peripheral blood mononuclear cells are associated with disease severity and preexisting dengue immune status. *PloS One*, 7(12), e51335. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0051335>

Tang, Y., Kou, Z., Zhang, F., Yao, X., Liu, S., Ma, J., ... Jin, X. (2010). Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult Chinese patients. *PloS One*, 5(12), e15631. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015631>

Thomas, L., Najioullah, F., Verlaeten, O., Martial, J., Briclher, S., Kaidomar, S., ... Césaire, R. (2010). Relationship between nonstructural protein 1 detection and plasma virus load in Dengue patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(3), 696–9. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0138>

Tricou, V., Minh, N. N., Farrar, J., Tran, H. T., & Simmons, C. P. (2011). Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia Are Shaped by Immune Status and Virus Serotype in Adults with Dengue. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1309. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001309>

Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., ... Nisalak, A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 2–9. <http://doi.org/10.1086/315215>

Wang, W.-K., Chen, H.-L., Yang, C.-F., Hsieh, S.-C., Juan, C.-C., Chang, S.-M., ... King, C.-C. (2006). Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(8), 1023–30. <http://doi.org/10.1086/507635>

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>

Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., ... Frankel, S. S. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 6(7), 816–20. <http://doi.org/10.1038/77553>

Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C., & Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1053–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698995>

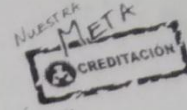
# ANEXOS

Anexo A. Instrumento.

CÓDIGO INDIVIDUO	GÉNERO	EDAD	SEVERIDAD CLÍNICA			VIREMIA	ANTIGENEMIA	FRECUENCIA DE CMSP INFECTADAS	INFECCIÓN PRIMARIA	INFECCIÓN SECUNDARIA			
			DENGUE SIN SIGNOS DE ALARMA	DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA	DENGUE GRAVE								



Anexo B. Aprobación comité de ética.



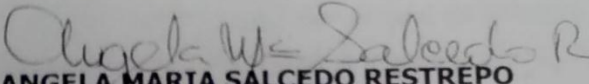
Neiva, 22 de Diciembre de 2010

Doctora  
**DORIS SALGADO GARCIA**  
Coordinadora  
**Infectología Pediátrica**  
Neiva

**ASUNTO:** Aprobación Comité Ética "IDENTIFICACION DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS CIRCULANTES NATURALMENTE INDUCIDAS EN NIÑOS INFECTADOS CON VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACION CON LA SEVERDIDAD CLINICA ", a partir de la fecha.

Cordial Saludo:

Una vez realizadas las aclaraciones sugeridas por el Comité De Ética del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo al Proyecto, "IDENTIFICACION DE LAS CELULAS PRODUCTORAS DE CITOQUINAS CIRCULANTES NATURALMENTE INDUCIDAS EN NIÑOS INFECTADOS CON VIRUS DENGUE Y SU ASOCIACION CON LA SEVERDIDAD CLINICA", según consta en Acta No. 031 del 22 de Diciembre de 2010, no se encuentran objeciones desde el punto de vista ético para la ejecución del estudio en el el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

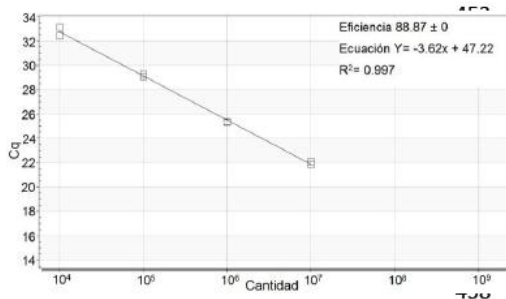
  
**ANGELA MARIA SALCEDO RESTREPO**  
Coordinadora Garantía de la Calidad

Proyecto: Indira Julieth Dussan

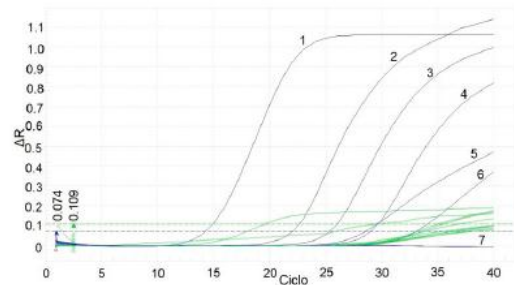
*¡ Servimos con calidez humana !*  
PBX: 8-71-59-07. Telefax: 8-71-44-15, 8-71-44-40, 8-71-91-91, 8-71-74-96  
[www.hospitaluniversitarioneiva.com.co](http://www.hospitaluniversitarioneiva.com.co) Email: [hospitalneiva@yahoo.com](mailto:hospitalneiva@yahoo.com)  
Dirección: Calle 9 Nro. 15-25. Neiva- Huila

## Anexo C. qPCR

**A.**

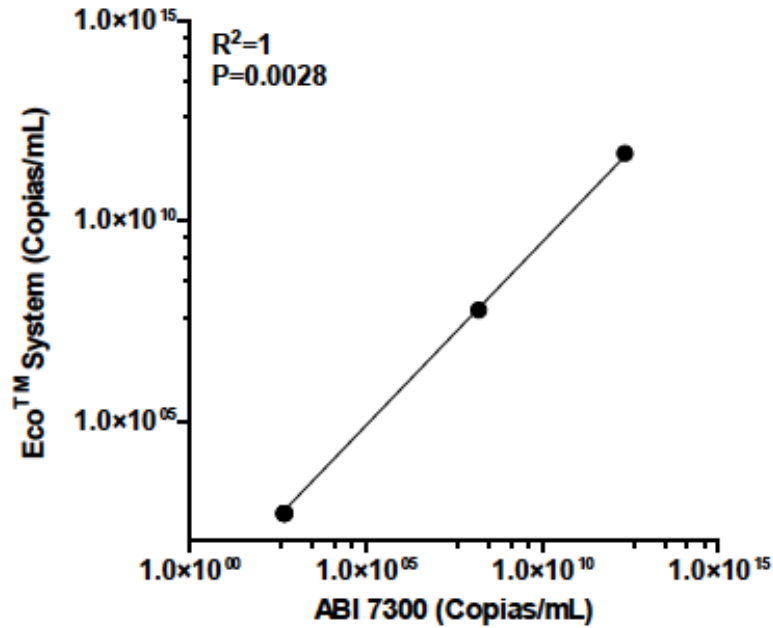


**B.**



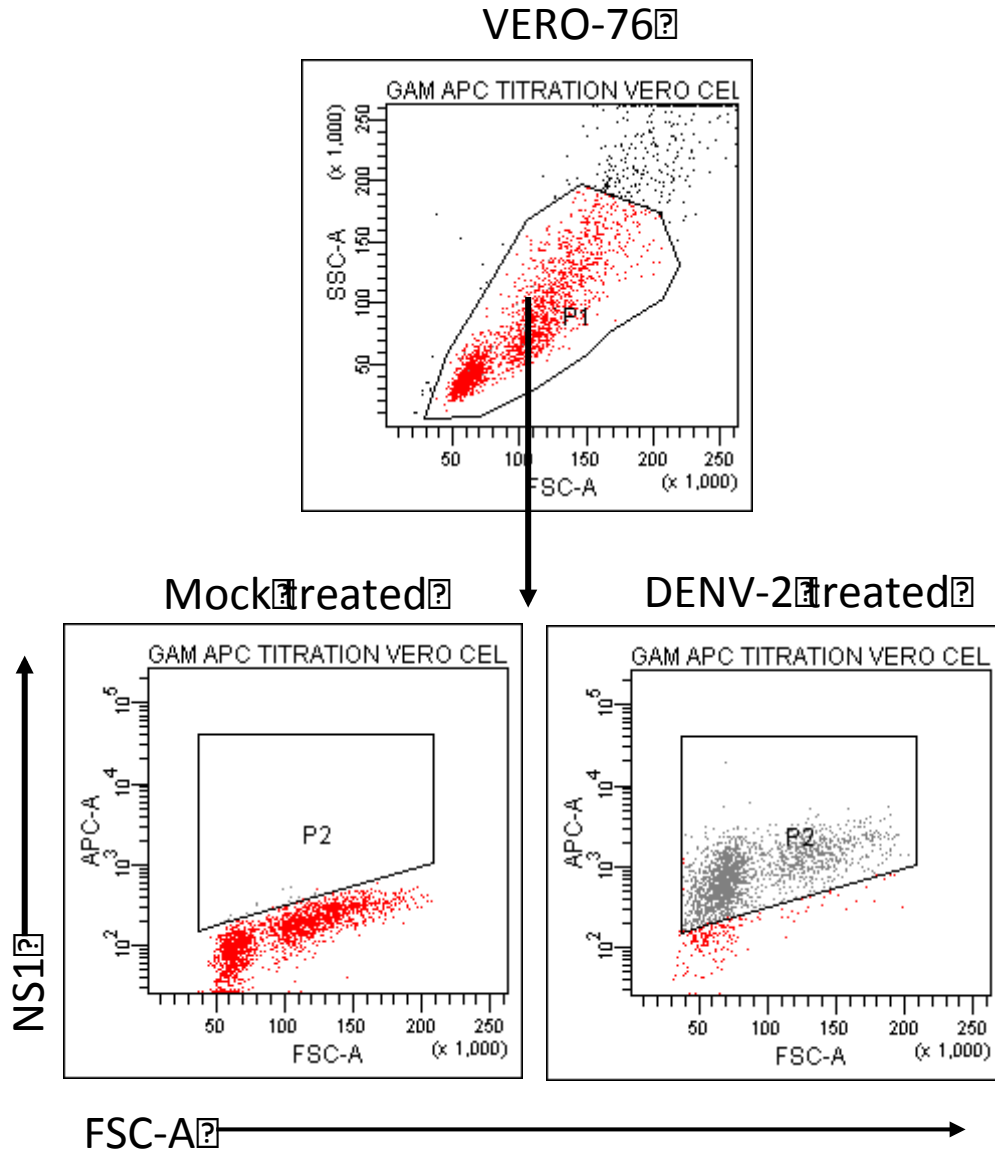
Curva estándar del estuche comercial (Shanghai ZJ Bio-Tech para serotipo 2) generada por el equipo Eco™ System, Illumina. En el eje Y se encuentra el ciclo de cuantificación (Cq) o ciclo en el que la señal de fluorescencia cruzó el umbral de detección y en el eje X se encuentra la cantidad del gen presente en cada muestra (escala logarítmica). Cada cuadro representa un punto de la curva, analizados por duplicado (diluciones seriadas 1:10, partiendo desde  $1 \times 10^7$  copias/mL hasta  $1 \times 10^4$  copias/mL). En la esquina superior derecha se muestran la eficiencia de la amplificación en cada ciclo de la qPCR, la ecuación de la curva y el  $R^2$  de ésta. **B.** Amplificación lineal ( $\Delta R$ ; unidades de fluorescencia normalizada al ruido de fondo en cada pozo) de las muestra a través de los ciclos de PCR del Eco™. Las líneas a trazos cortos azul y verde representan el umbral de detección para las muestras (0.074) y para el control interno de inhibición de la PCR (0.109), respectivamente; todas las muestras que sobrepasaron éste umbral fueron cuantificadas. Cada línea azul representa a una muestra o estándar y las líneas verdes representan sus respectivos controles internos de amplificación. 1: Lisado de células VERO infectadas con DENV-2; 2: Control positivo,  $1 \times 10^7$  copias/mL; 3: Control positivo,  $1 \times 10^6$  copias/mL; 4: Control positivo,  $1 \times 10^5$  copias/mL; 5: Plasma de niño con infección por DENV-2; 6: Control positivo,  $1 \times 10^4$  copias/mL; 7: Lisado celular no infectado, lisado celular infectado con DENV-1 y plasma de niño con infección por DENV-1. (Perdomo F y col., En revisión., 2014)

**Anexo D. Eco™ System vs ABI 7300.**



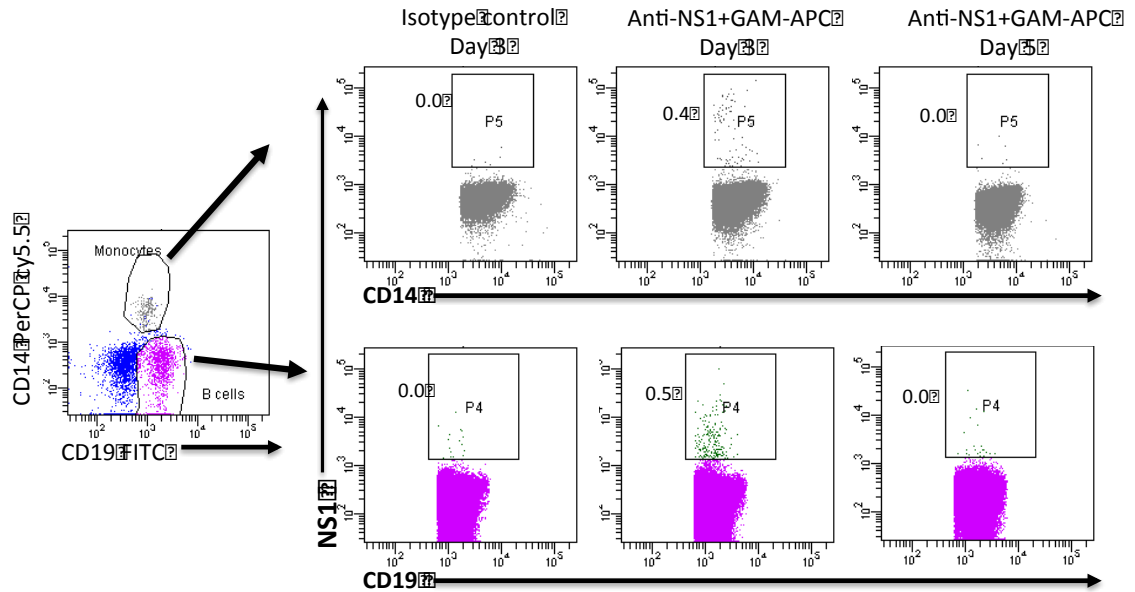
Correlación entre el número de copias/mL de DENV-2 detectado por los dos equipos de qPCR probados. El promedio del duplicado de cada muestra, analizadas en los equipos Eco™ y ABI 7300, fue comparado para hallar la correlación entre el número de copias/mL de ARN de DENV-2. Cada punto representa el promedio del duplicado de una muestra. En el extremo superior izquierdo se muestra el grado de correlación.

## Anexo E. Infección de células Vero.



Celulas Vero-76 fueron tratadas con mock (control negativo) o DENV-2 por 45 minutos, lavadas e incubadas por 48h. Luego, las células fueron fijadas-permeabilizadas y un anticuerpo monoclonal anti-NS1 proveniente de ratón, fue adherido. Después de 30 minutos de incubación, las células fueron lavadas y un APC anti-ratón fué aplicado por 30 minutos. Finalmente, las células fueron lavadas con perm-wash y adquiridas en un FACS canto II.

**Anexo F.** Expresión intracelular de NS1 de virus dengue en células mononucleares de sangre periférica de un niño infectado naturalmente.



Expresión intracelular de NS1 de virus dengue en células mononucleares de sangre periférica de un niño infectado naturalmente. Se evaluó por citometría de flujo el día 3 y 5 después del inicio de la fiebre. GAM-APC: Goat anti-mouse APC.

**Anexo G. Cronograma.**

<b>Actividad /Tiempo (Meses)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
Enrolamiento de voluntarios Detección de CMSP infectadas por DENV	■	■	■	■	■	■	■					
Determinación de viremia y NS1							■					
Análisis de resultados								■	■	■		
Entrega de informe final											■	■

Anexo H. Presupuesto.

Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación (en miles de \$).

RUBROS	FUENTES		TOTAL
	COLCIENCIAS	CONTRAPARTIDA USCO.	
PERSONAL		10,000	10,000
EQUIPOS		16,000	16,000
SOFTWARE			
MATERIALES		17,000	17,000
SALIDAS DE CAMPO			
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO			
PUBLICACIONES Y PATENTES		2,000	2,000
SERVICIOS TÉCNICOS			
VIAJES		5,000	5,000
CONSTRUCCIONES	No financiable		
MANTENIMIENTO	No financiable		
ADMINISTRACION	(3% del total solicitado)		
<b>TOTAL</b>		<b>50,000</b>	<b>50,000</b>

Descripción y justificación de los viajes (en miles de \$)

Lugar /No. De viajes	Justificación**	Pasajes (\$)	Estadía (\$)	Total días	Recursos	Total
					USCO	
Medellín	Congreso Nacional	1,000	500	4	1,500	1,500
Boston	Congreso internacional	1,200	2,3000	4	3,500	3,500
<b>TOTAL</b>					5,000	5,000

**Materiales y suministros (en miles de \$)**

<b>Materiales*</b>	<b>Justificación</b>	<b>Valor</b>
Kit IgM, IgG para DENV	Diagnóstico de dengue	4,000
Kits Qpcr	Cuantificación carga viral	4,000
Anti-CD14 y anti-CD19	Detección monocitos – Linfocitos B por citometría	4,000
Kit de NS1	Evaluación de la antigenemia	2,000
Puntas, buffers, material plástico		3,000

**Descripción de los equipos que se planea adquirir (en miles de \$).**

<b>EQUIPO</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>RECURSOS</b>		<b>TOTAL</b>
		<b>Colciencias</b>	<b>Contrapartida</b>	
Centrífuga refrigerada	Aislamiento CMSP de niños		16,000	16,000
<b>TOTAL</b>				16,000



## Anexo I. Prueba Piloto.

El primer componente a evaluar (número de copias de ARN de DENV/mL) se realiza por PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) usando el equipo Eco™ System, Illumina. Para determinar nuestra capacidad para el desarrollo de éste ensayo, DENV-2 en muestras de plasma de niños con infección natural por DENV (1 y 2, respectivamente) y lisado de cultivo de células Vero-76 infectadas fue cuantificado **(Ver anexo III y IV)**. Ya que los resultados soportan la eficiencia del ensayo para la cuantificación de la carga viral de DENV, los cuatro serotipos virales serán detectados en muestras de plasma de niños con infección natural cuyas muestras ya han sido recolectadas y en su mayoría serotipificadas y, según lo establecido en el cronograma de actividades, se realizarán tres sets de experimentos, con inclusión de los respectivos controles positivos en cada uno de ellos (lisado de cultivo de células Vero-76 infectadas).

La antigenemia será evaluada a través de Elisa para detección de la proteína viral NS1 usando un estuche comercial. Como muestra la tabla 1, la mayoría de los individuos incluidos cuyas muestras fueron analizadas demostraron positividad para ésta, por lo que posteriormente un análisis semicuantitativo (título límite detectable) será realizado mediante diluciones seriadas de muestras de plasma. Una estrategia similar a la utilizada para la medición de la viremia será empleada y se realizarán tres sets de experimentos con muestras de plasma ya recolectadas.

El tercer parámetro a evaluar es la frecuencia de CMSP naturalmente infectadas por DENV. En experimentos preliminares se tituló el anticuerpo anti-NS1 y el anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a alofocianina (APC), usando células VERO-76 infectadas con DENV-2. Como muestra el anexo 3, después de 48h de infección, el 90% de las células expresaron NS1 intracelular, soportando la capacidad de detección de células infectadas. Resultados en CMSP de niños naturalmente infectados demostraron que células NS1<sup>+</sup> circulan antes del 4 día de iniciado los síntomas, desapareciendo al día 5. La mayoría de CMSP NS1<sup>+</sup> fueron CD14<sup>+</sup> o CD19<sup>+</sup>, indicando que los monocitos y linfocitos B soportan la replicación viral **(ver anexo V)**. Ya que en el Laboratorio de Infección e Inmunidad CMSP son criopreservadas eficientemente, con adecuados porcentajes de recuperación y viabilidad celular después de la criopreservación **(ver anexo VI, Perdomo F y col., en preparación, 2015)** y éstas son frecuentemente usadas para ensayos

fenotípicos de forma confiable , CMSP ya recolectadas y criopreservadas serán usadas para la detección de células naturalmente infectadas en tres sets de experimentos, según lo establecido en el cronograma de actividades.

El principal problema que se ha presentado es el poco volumen del anticuerpo anti-NS1 hecho en ratón, por lo cual un anticuerpo anti-DENV (contra los cuatro serotipos) especificado en la metodología ha sido adquirido y estamos a la espera de la llegada del mismo.

Con ésta propuesta de solución esperamos cumplir, según lo establecido en el cronograma, todos los objetivos de éste proyecto.