



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, febrero de 2020

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jorge Luis Sánchez Vargas, con C.C. No. 1083882874, Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Evaluación de la utilidad de la guía revisada de la Organización Mundial de la Salud 2009 en estudios Inmunológicos de Dengue Pediátrico presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Especialista en Pediatría;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Evaluación de la utilidad de la guía revisada de la Organización Mundial de la Salud 2009 en estudios Inmunológicos de Dengue Pediátrico.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Sánchez Vargas	Jorge Luis

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Salgado	Doris Martha Cecilia
Narváez	Carlos Fernando

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Especialista en Pediatría

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Especialización en Pediatría

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2020

NÚMERO DE PÁGINAS: 52

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin
ilustraciones___ Tablas o Cuadros

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria): **TESIS LAUREADA**

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

Inglés

- | | |
|--------------------------|--------------------|
| 1. Virus dengue | Dengue virus |
| 2. DENV | DENV |
| 3. Interleuquina | Interleukin |
| 4. pacientes pediátricos | pediatric patients |
| 5. citoquinas | cytokine |
| 6. convalecientes | convalescent |

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

En el presente estudio se propuso determinar la utilidad de la clasificación 2009 en estudios inmunológicos pediátricos que analizan citoquinas (particularmente, la Interleuquina [IL]-6 e IL-8) en los diferentes grupos de severidad clínica. Además, se buscó establecer si existen diferencias en el patrón de citoquinas proinflamatorias circulantes, en niños con formas leves a severas de la infección confirmada por DENV, cuando se aplica la clasificación de la OMS de 1997 y la clasificación revisada de 2009.

Para esto, se realizó un estudio ambispectivo con 116 pacientes pediátricos incluidos en el registro clínico del Programa de Medicina de la Universidad Surcolombiana, el Hospital Universitario de Neiva y la E.S.E. Carmen Emilia Ospina de Neiva, con infección confirmada por DENV y a quienes, en la fase aguda y de convalecencia, se les tomó muestra de plasma. A todos los niños incluidos se les midieron los niveles plasmáticos de interleuquina (IL)-6 e IL-8 usando un ensayo de citometría de flujo multiplex basado en esferas. La identificación de los pacientes usando las dos clasificaciones fue realizada por expertos del departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva a partir de los registros médicos existentes.

Para definir la utilidad de las clasificaciones de dengue en estudios que evalúan factores inmunes como citoquinas, se compararon los patrones de las mismas en cada uno de los grupos obtenidos con cada clasificación, y se analizaron con métodos estadísticos no paramétricos. La sensibilidad y especificidad de cada citoquina para diferenciar las formas severas de la infección en cada una de las dos clasificaciones se obtuvo mediante el análisis de curva ROC.

Aquí se muestra que la IL-6 e IL-8 circulantes se encuentran elevadas durante la fase aguda de la enfermedad y disminuyeron en la convalecencia. Con la actual clasificación de 2009 se demostró un incremento significativo en los niveles de IL-6 e IL-8 en los pacientes Dengue con signos de alarma y Dengue grave cuando se comparan con el grupo Dengue sin signos de alarma, mientras que con la clasificación de 1997 no se obtuvo diferencias entre los grupos. Las dos clasificaciones mostraron

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



capacidad comparable para identificar casos de enfermos con respecto a los sanos (convalecientes) para las dos citoquinas (AUC < 0.76, P < 0.0006). Sin embargo, la clasificación 2009 fue superior a la 1997 identificando entre los enfermos, los casos de dengue grave con respecto a cuadros menos severos usando la IL-8 (AUC: 0.76, P=0.002 Vs AUC: 0.54, P=0.523). Para la IL-6 esta capacidad de identificación no fue tan robusta.

Los resultados aquí mostrados contribuyen a fortalecer a la clasificación actualmente aplicada en pacientes infectados con DENV al poder ser aplicable a estudios inmunológicos que ayudan a un mejor entendimiento de la fisiopatología de la infección por DENV en pacientes pediátricos.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

In the present study, it was proposed to determine the usefulness of the 2009 classification in pediatric immunological studies that analyze cytokines (particularly, Interleukin [IL] -6 and IL-8) in the different clinical severity groups. In addition, it was sought to establish whether there are differences in the pattern of circulating proinflammatory cytokines, in children with mild to severe forms of the infection confirmed by DENV, when the WHO classification of 1997 and the revised classification of 2009 are applied

For this, an ambispective study was conducted with 116 pediatric patients included in the clinical record of the Medicine Program of the Universidad Surcolombiana, the Neiva University Hospital and the E.S.E. Carmen Emilia Ospina de Neiva, with infection confirmed by DENV and to whom, in the acute and convalescence phase, plasma samples were taken. All included children were measured for interleukin (IL) -6 and IL-8 plasma levels using a spherical multiplex flow cytometry assay. The identification of the patients using the two classifications was made by experts from the Department of Pediatrics of the Universidad Surcolombiana and the University Hospital of Neiva from the existing medical records.

To define the usefulness of dengue classifications in studies evaluating immune factors such as cytokines, their patterns were compared in each of the groups obtained with each classification, and analyzed with non-parametric statistical methods. The sensitivity and specificity of each cytokine to differentiate the severe forms of infection in each of the two classifications was obtained by ROC curve analysis.

Here it is shown that circulating IL-6 and IL-8 are elevated during the acute phase of the disease and decreased in convalescence. With the current 2009 classification, a significant increase in the levels of IL-6 and IL-8 was demonstrated in Dengue patients with alarm signs and severe Dengue when compared with the Dengue group without alarm signs, while with the classification of 1997 no differences were obtained between the groups. The two classifications showed comparable capacity to identify cases of patients with respect to healthy (convalescent) cases for the two cytokines (AUC <0.76, P <0.0006). However, the 2009 classification was higher than 1997, identifying among the patients, cases of severe dengue with respect to less severe conditions using IL-8 (AUC: 0.76, P = 0.002 Vs AUC: 0.54, P = 0.523). For IL-6, this identification capacity was not as robust.

The results shown here contribute to strengthening the classification currently applied in patients infected with DENV by being able to be applicable to immunological studies that help a better understanding of the pathophysiology of DENV infection in pediatric patients.



APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado:

Firma:

Nombre Jurado: *Angela María Ortiz Sobogal*

Firma: *Angela María Ortiz Sobogal*

Nombre Jurado: *Sandra del Pilar Pérez López*

Firma: *Sandra Pérez López*

EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LA GUÍA REVISADA DE LA ORGANIZACIÓN
MUNDIAL DE LA SALUD 2009 EN ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS DE DENGUE
PEDIÁTRICO

JORGE LUIS SÁNCHEZ VARGAS

UNIVERSIDAD SUROLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
NEIVA, HUILA
2020

EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LA GUÍA REVISADA DE LA ORGANIZACIÓN
MUNDIAL DE LA SALUD 2009 EN ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS DE DENGUE
PEDIÁTRICO

JORGE LUIS SÁNCHEZ VARGAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Especialista en
Pediatria.

Asesores:

DORIS MARTHA CECILIA SALGADO M.D.
Pediatra Bioeticista

CARLOS FERNANDO NARVAEZ
Medico Inmunólogo PhD,

UNIVERSIDAD SUROLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
NEIVA, HUILA
2020

Nota de aceptación:

Por la calidad y metodología del presente trabajo se sugiere para obtener título de Pedagogía, y adicional el jurado determina si se cumplen criterios para obtención de trabajo mentado.

Firma del presidente del jurado

Cecilia María Ortiz Sosa

Firma del jurado

Sandra Pérez Rojas

Firma del jurado

Neiva, febrero del 2020.

DEDICATORIA

A mis padres, familiares y amigos por su apoyo incondicional, llamados de atención y orientación personal.

Por creer en mí y estar presente en los logros y fracasos que se presentaron en el camino.

Jorge Luis

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Al Doctor Carlos Fernando Narváz, Inmunólogo, asesor por incentivar el espíritu de investigación, ayudando a estructurar un pensamiento analítico, brindando herramientas para el ejercicio metódico del conocimiento inmunológico. Por romper los paradigmas que la clínica ofrece ante el conocimiento científico.

A la Universidad Surcolombiana y al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, por su constante apoyo en la formación de médicos integrales centrados en solucionar las necesidades locales de su población.

A la Doctora Doris Martha Cecilia Salgado, infinitas gracias, pues sin su constante motivación en aspectos académicos y personales; hacia usted mi mayor admiración y respeto.

Al Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Semillero de Formación en Infección e Inmunidad y auxiliares de laboratorio por su apoyo técnico, científico y motivacional para el desarrollo y culminación de esta investigación.

A Paula Ximena Losada por su ayuda para el análisis y diagramación de este trabajo.

A todos los pacientes que hicieron parte del estudio y a las personas indirectamente involucradas, infinitas gracias.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	16
1. JUSTIFICACIÓN	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	20
3.1 GENERALIDADES - PATOGÉNESIS	20
3.2 CITOQUINAS Y DENGUE, PAPEL DE LA IL-6 E IL-8	21
3.3 CLASIFICACIÓN PARA EL PACIENCIENTE CON DENGUE GUIA 1997	23
3.3.1 Fiebre dengue(DF)	23
3.4 FIEBRE HEMORRÁGICA DEL DENGUE (DHF)	24
3.5 SÍNDROME DE SHOCK DENGUE (DSS)	25
3.6 GUIA DE LA OMS 2009, ACTUALIZADA 2015	25
3.6.1 Diagnostico presuntivo de dengue	25
3.7 DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA	26

		pág.
3.8	DENGUE GRAVE	26
3.9	PRINCIPALES CAMBIOS A LA GUÍA DE LA OMS PARA DENGUE	26
4.	METODOLOGÍA	28
4.1	TIPO DE ESTUDIO	28
4.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	28
4.3	DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR DENV	29
4.4	DETECCIÓN DE CITOQUINAS	29
4.5	ANÁLISIS, CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y MANEJO DE LA INFORMACIÓN	29
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
6.	RESULTADOS	32
6.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	32
6.2	INFECCIÓN POR DENV EN NIÑOS, INDUCE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN PLASMA	37
6.3	PATRÓN DE IL-6 E IL-8 EN PLASMA OBTENIDO CUANDO LA CLASIFICACIÓN 2009 Y 1997 SON USADAS	38

		pág.
6.4	UTILIDAD DE NIVELES DE IL-6 E IL-8 PARA IDENTIFICAR GRAVEDAD CLÍNICA DEPENDIENDO DE LA CLASIFICACIÓN USADA	40
7.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	44
7.1	FONDOS	44
8.	DISCUSION	45
9.	CONCLUSIONES	48
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1	30

Diseño del estudio. Se representa de forma esquemática el estudio realizado a 116 pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de infección por DENV a quienes se les midieron las citoquinas IL-6 e IL-8 y fueron clasificados según las guías de la OMS de los años 1997 y 2009

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1	Características epidemiológicas, clínicas y paraclínicas de los pacientes	33

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Grafica 1 Niveles plasmáticos de IL-6 (A) e IL-8 (B) obtenidos durante la fase aguda, son significativamente mayores en comparación con la fase de convalecencia	37
Grafica 2 Distribución de los valores de IL-6 e IL-8 plasmática en los pacientes divididos usando las clasificaciones de 1997 y 2009	39
Grafica 3 Curva ROC IL 6 e IL 8 clasificación Dengue 2009 y 1997. IL6 e IL-8 como marcadores de severidad en Dengue según las clasificaciones de los años 2009 (A-C) y 1997 (B-D)	41
Grafica 4 Curva ROC IL 6 e IL 8 entre los grupos de las clasificaciones Dengue 2009 y 1997. IL6 e IL-8 como marcadores de severidad en Dengue para la clasificación de 2009 (A-C)	43

RESUMEN

En el presente estudio se propuso determinar la utilidad de la clasificación 2009 en estudios inmunológicos pediátricos que analizan citoquinas (particularmente, la Interleuquina [IL]-6 e IL-8) en los diferentes grupos de severidad clínica. Además, se buscó establecer si existen diferencias en el patrón de citoquinas proinflamatorias circulantes, en niños con formas leves a severas de la infección confirmada por DENV, cuando se aplica la clasificación de la OMS de 1997 y la clasificación revisada de 2009.

Para esto, se realizó un estudio ambispectivo con 116 pacientes pediátricos incluidos en el registro clínico del Programa de Medicina de la Universidad Surcolombiana, el Hospital Universitario de Neiva y la E.S.E. Carmen Emilia Ospina de Neiva, con infección confirmada por DENV y a quienes, en la fase aguda y de convalecencia, se les tomó muestra de plasma. A todos los niños incluidos se les midieron los niveles plasmáticos de interleuquina (IL)-6 e IL-8 usando un ensayo de citometría de flujo multiplex basado en esferas. La identificación de los pacientes usando las dos clasificaciones fue realizada por expertos del departamento de Pediatría de la Universidad Surcolombiana y el Hospital Universitario de Neiva a partir de los registros médicos existentes.

Para definir la utilidad de las clasificaciones de dengue en estudios que evalúan factores inmunes como citoquinas, se compararon los patrones de las mismas en cada uno de los grupos obtenidos con cada clasificación, y se analizaron con métodos estadísticos no paramétricos. La sensibilidad y especificidad de cada citoquina para diferenciar las formas severas de la infección en cada una de las dos clasificaciones se obtuvo mediante el análisis de curva ROC.

Aquí se muestra que la IL-6 e IL-8 circulantes se encuentran elevadas durante la fase aguda de la enfermedad y disminuyeron en la convalecencia. Con la actual clasificación de 2009 se demostró un incremento significativo en los niveles de IL-6 e IL-8 en los pacientes Dengue con signos de alarma y Dengue grave cuando se comparan con el grupo Dengue sin signos de alarma, mientras que con la clasificación de 1997 no se obtuvo diferencias entre los grupos. Las dos clasificaciones mostraron capacidad comparable para identificar casos de enfermos con respecto a los sanos (convalecientes) para las dos citoquinas (AUC < 0.76, P < 0.0006). Sin embargo, la clasificación 2009 fue superior a la 1997 identificando entre los enfermos, los casos de dengue grave con respecto a cuadros menos severos usando la IL-8 (AUC: 0.76, P=0.002 Vs AUC: 0.54, P=0.523). Para la IL-6 esta capacidad de identificación no fue tan robusta.

Los resultados aquí mostrados contribuyen a fortalecer a la clasificación actualmente aplicada en pacientes infectados con DENV al poder ser aplicable a estudios inmunológicos que ayudan a un mejor entendimiento de la fisiopatología de la infección por DENV en pacientes pediátricos.

Palabras claves. Virus dengue, DENV, Interleuquina [IL]-6 e IL-8, pacientes pediátricos, citoquinas, convalecientes.

SUMMARY

In the present study, it was proposed to determine the usefulness of the 2009 classification in pediatric immunological studies that analyze cytokines (particularly, Interleukin [IL] -6 and IL-8) in the different clinical severity groups. In addition, it was sought to establish whether there are differences in the pattern of circulating proinflammatory cytokines, in children with mild to severe forms of the infection confirmed by DENV, when the WHO classification of 1997 and the revised classification of 2009 are applied

For this, an ambispective study was conducted with 116 pediatric patients included in the clinical record of the Medicine Program of the Universidad Surcolombiana, the Neiva University Hospital and the E.S.E. Carmen Emilia Ospina de Neiva, with infection confirmed by DENV and to whom, in the acute and convalescence phase, plasma samples were taken. All included children were measured for interleukin (IL) -6 and IL-8 plasma levels using a spherical multiplex flow cytometry assay. The identification of the patients using the two classifications was made by experts from the Department of Pediatrics of the Universidad Surcolombiana and the University Hospital of Neiva from the existing medical records.

To define the usefulness of dengue classifications in studies evaluating immune factors such as cytokines, their patterns were compared in each of the groups obtained with each classification, and analyzed with non-parametric statistical methods. The sensitivity and specificity of each cytokine to differentiate the severe forms of infection in each of the two classifications was obtained by ROC curve analysis.

Here it is shown that circulating IL-6 and IL-8 are elevated during the acute phase of the disease and decreased in convalescence. With the current 2009 classification, a significant increase in the levels of IL-6 and IL-8 was demonstrated in Dengue patients with alarm signs and severe Dengue when compared with the Dengue group without alarm signs, while with the classification of 1997 no differences were obtained between the groups. The two classifications showed comparable capacity to identify cases of patients with respect to healthy (convalescent) cases for the two cytokines (AUC <0.76, P <0.0006). However, the 2009 classification was higher than 1997, identifying among the patients, cases of severe dengue with respect to less severe conditions using IL-8 (AUC: 0.76, P = 0.002 Vs AUC: 0.54, P = 0.523). For IL-6, this identification capacity was not as robust.

The results shown here contribute to strengthening the classification currently

applied in patients infected with DENV by being able to be applicable to immunological studies that help a better understanding of the pathophysiology of DENV infection in pediatric patients.

Key words. Dengue virus, DENV, Interleukin [IL] -6 and IL-8, pediatric patients, cytokine, convalescent.

INTRODUCCION

El dengue es un importante problema de Salud Pública, ya que se calculan 390 millones de infecciones anualmente ¹. Dos tercios de la población mundial está en riesgo de contraer la infección por este virus transmitido por mosquitos del género *Aedes* ². Localmente, la infección con virus dengue (DENV) ha sido responsable de cerca de 25,000 casos de infección sintomática desde el 2010 en el Departamento del Huila, región que de forma regular aparece en las estadísticas como una de las mayores aportantes de número de casos y formas severas de la infección (SIVIGILA, semana 53. 2011 a 2015). Así la infección es responsable de una alta carga de morbilidad y mortalidad empeorada además, por la carencia de vacuna localmente disponible o un tratamiento antiviral específico ³. Actualmente el departamento del Huila se encuentra en epidemia que inició tempranamente en el 2019, reportándose cerca de 11,238 casos probables de dengue, de los cuales 281 fueron casos de dengue grave. (Boletín epidemiológico, INS, 2019).

En 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó la enfermedad del dengue en 3 grupos basado en expresiones de procesos fisiopatológicos como la hemorragia y la fuga vascular, así: fiebre por dengue (DF), fiebre hemorrágica por dengue (DHF) y síndrome de shock por dengue (DSS) ⁴; La aparición de nuevos signos en el espectro clínico como la miocarditis (condición severa carente de hemorragia o fuga vascular), las limitaciones predictivas de los casos que desarrollan formas severas y el incremento regular cíclico de los casos de infecciones severas y casos fatales globales, motivó a la OMS a través de un consenso de expertos, a realizar una revisión de la guía existente. En el 2009 la OMS recomienda el uso de una nueva clasificación, que clínicamente divide a los casos de dengue en: dengue sin signos de alarma (DSSA), dengue con signos de alarma (DCSAS) y dengue grave (DG) ⁵. Varios estudios que usaron la guía revisada han mostrado una alta sensibilidad para identificar tempranamente los casos severos, y predecir los casos que podrían agravarse ⁶⁻⁷⁻⁸, siendo por lo tanto, de utilidad en la práctica clínica en las zonas endémicas de países en vías de desarrollo, por su fácil aplicación que no se requiere parámetros de laboratorio de alta complejidad, puesto que está basada principalmente en signos y síntomas clínicos ⁹⁻¹⁰. Aunque esta clasificación ha mostrado importantes ventajas, su utilidad en estudios que analizan aspectos de inmunidad al virus, como la respuesta de citoquinas en dengue y otros, no es aún clara ¹¹⁻¹⁸. Por ejemplo, en el grupo de pacientes clasificados como dengue con signos de alarma, son incluidos individuos que presentan manifestaciones clínicas fisiopatológicamente tan diversas como el vómito, dolor abdominal, sangrado de mucosas entre otras.

Debido a que la respuesta inmune está implicada en la fisiopatología de la infección y que particularmente, algunas citoquinas séricas como la interleuquina (IL)-6 e IL-8 ha sido asociada con severidad clínica ¹², el preciso conocimiento del patrón de citoquinas inflamatorias en cada una de los estadios del espectro clínico de la infección es crítico para entender la patogénesis de la enfermedad y vital para determinar, por ejemplo, nuevos blancos terapéuticos o correlatos de protección anticuerpo independientes ante la infección.

La pregunta que se desea responder es:

¿Es útil la clasificación revisada para dengue 2009 en estudios inmunológicos pediátricos que analizan el papel de citoquinas en los diferentes estadios clínicos de la infección?

1.JUSTIFICACIÓN

La comprensión de la historia natural de la infección por DENV, no sólo a nivel clínico sino a nivel celular, es de vital importancia para el descubrimiento de marcadores predictores de severidad, que permitan la detección temprana de casos potencialmente severos, con el fin de instaurar un tratamiento oportuno y disminuir la mortalidad y parte de la carga de la enfermedad. La clasificación revisada del 2009 ha mostrado ser útil para esto. Sin embargo, en esta guía aparecen los casos de dengue con signos de alarma, que incluye a un grupo heterogéneo de pacientes con signos y síntomas que indican clínicamente que puede evolucionar hacia un caso severo, aunque su valor o relevancia dentro del estudio de la fisiopatología de la infección de pacientes que refieren síntomas como dolor abdominal (una gran fracción de niños con dengue con signos de alarma son clasificados dentro de este grupo al referir este síntoma), hace necesaria la determinación de su utilidad en estudios que evalúan marcadores inmunes comúnmente usados como las citoquinas.

Aunque se han realizado pocos trabajos anteriores que comparan la utilidad clínica de las dos clasificaciones, hasta el momento no se han realizado estudios suficientes que busquen determinar si existen ventajas al utilizar la clasificación de 1997 de la OMS sobre la de 2009 en estudios de marcadores inmunes como las citoquinas en niños con dengue .¹³ En concordancia con esto, en el año 2015 se realizó un nuevo consenso de expertos de los países miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en la Habana/Cuba con el fin de actualizar las recomendaciones del 2009 y discutir la evidencia existente de la utilidad de esta clasificación en estudios fisiopatológicos y una de las grandes conclusiones fue la falta de evidencia de la utilidad de la clasificación revisada y sus criterios en este particular tipo de estudios ⁸.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de la clasificación revisada para dengue del 2009 en estudios inmunológicos pediátricos que evalúan citoquinas en los diferentes estados clínicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Identificar si el patrón de citoquinas (IL-6 e IL-8) asociado a los grados de severidad de la infección por DENV es dependiente de la clasificación usada.

Determinar si hay asociación entre estas citoquinas y la severidad clínica en los niños con dengue clasificados con las dos clasificaciones.

Determinar la utilidad de las citoquinas evaluadas para identificar casos graves de la infección cuando éstos son identificados con una u otra clasificación.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 GENERALIDADES – PATOGENESIS

El DENV es miembro de la familia *Flaviviridae* y el género *Flavivirus*, es un virus que tiene envoltura, genoma ARN simple de polaridad positiva con cuatro serotipos conocidos (DENV 1-4), los que muestran una alta homología con otros *Flavivirus* como el zika, el virus del Nilo Occidental, la Encefalitis Japonesa y virus de la Fiebre Amarilla ¹⁴. La infección por virus dengue tiene un período de incubación de 4-10 días en el cuerpo humano. Después del período de incubación la enfermedad comienza abruptamente y es seguida por las tres fases: febril, crítica y recuperación.

La fase febril se caracteriza por fiebre de alto grado y síntomas inespecíficos que son indistinguibles entre casos de dengue grave y no severo. En la fase crítica, la temperatura disminuye y hay un aumento de la permeabilidad capilar en paralelo con el aumento de los niveles de hematocrito. La fuga de plasma suele estar precedida por leucopenia progresiva y una rápida disminución en el recuento de plaquetas. En este punto, los pacientes sin un aumento en la permeabilidad capilar mejorarán, mientras que aquellos con aumento de la permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida de volumen plasmático ¹⁵.

Cuando se pierde un volumen crítico de plasma por fugas, se produce un choque. Si se prolonga, conducirá a la hipoperfusión del órgano, causando deterioro progresivo del órgano, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. Si el paciente sobrevive a la fase crítica de 24-48 horas, se produce una reabsorción gradual del líquido del compartimiento extravascular en las siguientes 48-72 horas.

La progresión de la enfermedad a casos graves se ha asociado a particularmente dos mecanismos dentro de la respuesta inmune, que son la amplificación dependiente de anticuerpos y la tormenta de citoquinas ¹⁶⁻¹⁷. Probablemente la respuesta fisiopatológica de evolución a casos severos de la infección, no se explica exclusivamente por las respuestas inflamatorias inducidas por citoquinas, sino también por patrones moleculares asociados a daño generados durante el proceso inflamatorio ¹⁸.

Como se mencionó, las características clínicas de la infección se explican parcialmente por el hecho de que el DENV tiene tropismo por células del sistema inmune como los monocitos-macrófagos y el endotelio, causando activación de las células como las endoteliales, lo que media la fuga plasmática. La activación de

monocitos y células T infectadas, el sistema del complemento y la producción de mediadores, citoquinas y receptores solubles también pueden estar implicados en la disfunción de las células endoteliales ⁵.

3.2 CITOQUINAS Y DENGUE, PAPEL DE LA IL-6 E IL-8

Las citoquinas son un grupo de pequeñas proteínas altamente difundibles, que sirven como mensajeras y moduladoras de la respuesta inmune. Numerosos estudios han analizado los perfiles de citoquinas circulantes en pacientes infectados con DENV y regularmente se ha reportado un incremento de citoquinas proinflamatorias durante la infección¹⁹. De hecho, varios de estos trabajos han encontrado una asociación entre el nivel de algunas citoquinas y la severidad de las manifestaciones clínicas de la infección^{20 21 22}.

IL-6 es descrita como una citoquina multifuncional que actúa en diferentes células para inducir una variedad de respuestas biológicas que involucran señales de regulación y transducción. Clásicamente se le conoce como una proteína proinflamatoria secretada por células T, monocito-macrófagos, células naturales killer y células endoteliales para estimular la respuesta. También se comporta como pirógeno y es un potente mediador de fiebre durante la fase aguda de la infección. Adicionalmente, facilita la cascada de la coagulación junto con otras citoquinas proinflamatorias.²³ Se piensa que existe una relación cercana entre el incremento de IL-6 y casos severos debido a que ésta no solo actúa como marcador de activación de la coagulación y fibrinólisis, sino también está implicada en el inicio y regulación de la homeostasis.²⁴

Su papel en la inmunopatogénesis de la infección por DENV es aún motivo de estudio y la información existente es variable. Algunos estudios han encontrado incrementos de IL-6 en pacientes con dengue grave en comparación con formas menos comprometidas clínicamente, mientras que otros no muestran asociación.^{25,26}

En un estudio se evaluaron los niveles de IL-6 de pacientes con DENV según la clasificación de la OMS en 2009 y encontraron que la concentración de dicha citoquina fue menor en DSSA al compararlos con el grupo DCSA. Mientras que los niveles fueron mayores en DS en comparación con los otros grupos, lo que sugiere mayor severidad.²⁵ En otro estudio basado en la antigua clasificación, reportaron que los pacientes infectados con el serotipo 2 que fueron diagnosticados con DHF tuvieron niveles considerablemente elevados de IL-6 en comparación con la infección leve y el grupo control.²⁷

Por otra parte, la IL-8 es otra citoquina proinflamatoria involucrada en la permeabilidad vascular y la activación del sistema inmune innato. Es producida por monocitos, células endoteliales y hepatocitos.¹⁷ Al tiempo se le describe como quimiocina y se ha demostrado que induce la liberación de enzimas líticas, factor activador de plaquetas, leucotrienos y la infiltración de neutrófilos.²⁸

En intentos por establecer los mecanismos implicados en la severidad de la infección por DENV previos estudios han reportado la inducción *in vitro* de IL-8 en pacientes con dengue grave. En uno de ellos, se utilizaron anticuerpos neutralizantes contra IL-8 que inhibieron parcialmente los cambios inducidos por el medio de cultivo, así como los inducidos por la adición de IL-8, sugiriendo que la IL-8 está implicada en la aparición de alteraciones en la permeabilidad del endotelio microvascular y ser un factor responsable de la fuga plasmática y por lo tanto, gravedad clínica.²⁹ Otro estudio reportó incremento en los niveles séricos de IL-8 de pacientes con DHF comparado con controles normales asociándose a un incremento en la severidad y mortalidad de los pacientes.³⁰

Basados en la clasificación de 1997, dos cambios fisiopatológicos principales ocurren en DHF/DSS. Una es una permeabilidad vascular aumentada que da lugar a la pérdida de plasma del compartimiento vascular. Esto da lugar a su vez a hemoconcentración, baja presión de pulso y otros signos de shock, si la pérdida de plasma se vuelve crítica. El segundo cambio ocurre en la hemostasia e implican trastornos vasculares, trombocitopenia y coagulopatía. Un hallazgo constante en DHF/DSS es la activación del sistema del complemento, con caída de los niveles C3 y C5³¹. Los mediadores que aumentan la permeabilidad vascular y los mecanismos precisos de los fenómenos hemorrágicos observados en las infecciones por dengue aún no han sido completamente identificados, aunque se piensa que algunas citoquinas juegan un papel crítico; en consecuencia, se necesitan más estudios que busquen esta asociación.

Los defectos plaquetarios pueden ser tanto cualitativos como cuantitativos, es decir, algunas plaquetas circulantes durante la fase aguda del dengue hemorrágico pueden agotarse (incapaces de funcionar normalmente). Por lo tanto, incluso un paciente con un recuento plaquetario superior a 100,000/mm³ puede tener un tiempo prolongado de sangrado. Un mecanismo que puede contribuir al desarrollo de DHF/DSS es el aumento en la captación y replicación intracelular del virus en macrófagos debido a la existencia previa de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes o sub-neutralizantes, fenómeno que en conjunto es llamado amplificación dependiente de anticuerpos. De hecho, el 90% de los casos de dengue severo se presenta en pacientes con evidencia serológica de exposiciones previas a serotipos diferentes de DENV. Así, en infecciones secundarias con un virus de un serotipo diferente al que causa la infección primaria, los anticuerpos de

reactividad cruzadas que no neutralizan el virus pueden aumentar el número de monocitos infectados a medida que se incorporan a estas células complejos de anticuerpos contra el virus del dengue. Esto a su vez puede resultar en la activación de células T CD4+ y CD8+ de reactividad cruzada. La liberación rápida de citoquinas y reactantes derivados del oxígeno, causada por la activación de células T y por la lisis de monocitos infectados mediados por linfocitos citotóxicos, puede dar como resultado la fuga de plasma y la hemorragia que se producen en la fiebre dengue hemorrágico ³².

Todo lo anterior soporta la importancia del adecuado análisis de las citoquinas en dengue y la necesidad de estudios que identifiquen el papel de estas en las consecuencias clínicas de la infección.

3.3 CLASIFICACION PARA EL PACIENTE CON DENGUE GUIA 1997

La guía de 1997 propone las siguientes categorías:

3.3.1 Fiebre dengue(DF)

Probable: una enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones:

- Dolor de cabeza.
- Dolor retro-orbital
- Mialgia
- Artralgia
- Erupción cutánea
- Manifestaciones hemorrágicas
- Leucopenia.

Sumado a:

– Serología de soporte (un título de anticuerpo de inhibición de la hemaglutinación recíproca con títulos mayor o igual a 1,280, un título comparable de IgG DENV-específica de un ensayo inmunoabsorción ligado a enzima o un ensayo de anticuerpo IgM positivo en una muestra de suero de fase aguda o convaleciente tardía)

- Ocurrencia en el mismo lugar y tiempo que otros casos confirmados de dengue.
- Confirmado: un caso confirmado por criterios de laboratorio (ver abajo).
- Reportable: cualquier caso probable o confirmado debe ser reportad.

Los criterios de laboratorio para la confirmación del dengue son:

- Aislamiento del DENV en cultivo celular a partir de muestras de suero o autopsia;
- O

- Demostración de un cambio cuádruple o mayor en títulos de anticuerpos IgG o IgM virus-específicos recíprocos a uno o más antígenos del virus del dengue en muestras de suero pareadas.

Ó

- Demostración del antígeno del DENV en muestras de tejido de casos fatales, suero o cerebroespinal mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o ELISA.

Ó

- Detección de secuencias genómicas del DENV en muestras de suero de tejido de autopsia o líquido cefalorraquídeo mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

3.4 FIEBRE HEMORRÁGICA DEL DENGUE (DHF)

Deben estar presentes todos:

- Fiebre, o historia de fiebre aguda, que dura de 2 a 7 días, ocasionalmente bifásica.
- Tendencias hemorrágicas, evidenciadas por al menos una de las siguientes: - test de torniquete positivo - petequias, equimosis o púrpura - hemorragia de mucosas, tracto gastrointestinal, sitios de inyección u otros lugares - hematemesis o melena.

- Trombocitopenia (100,000 células por mm³ o menos)
- Evidencia de fuga de plasma debido al aumento de la permeabilidad vascular, manifestada por al menos uno de los siguientes: aumento del hematocrito igual o superior al 20% por encima de la media para la edad, el sexo y la población; - una disminución del hematocrito después del tratamiento de sustitución de volumen igual o superior al 20% de la línea de base; - signos de fuga plasmática como derrame pleural, ascitis e hipoproteinemia.

3.5 SÍNDROME DE SHOCK DENGUE (DSS)

Deben estar presentes todos los cuatro criterios anteriores para la FHD, además de evidencia de insuficiencia circulatoria manifestada por:

- Pulso rápido y débil, y
- Presión de pulso estrecha (menor a 20 mmHg [2.7 kPa]) o manifestada por:
 - Hipotensión por edad,
 - Piel fría, húmeda e inquietud ⁴

3.6 GUIA DE LA OMS 2009, ACTUALIZADA 2015

3.6.1 Diagnostico presuntivo de dengue

Vive o ha viajado a área endémica. Fiebre y dos de los siguientes:

- Anorexia y nauseas
- Rash
- Dolor y malestar
- Signos de alarma
- Leucopenia
- Test de torniquete positivo

- Dengue confirmado por laboratorio, con los mismos criterios mencionados anteriormente.

3.7 DENGUE CON SIGNOS DE ALARMA

- Dolor abdominal o distensión
- Vomito persistente
- Acumulación clínica de fluidos
- Sangrado de mucosas
- Letargia, inquietud
- Hepatomegalia mayor a 2cm
- Laboratorio: aumento del hematocrito

3.8 DENGUE GRAVE

- Fuga plasmática severa que lleva a shock y acumulación de líquidos con “distrés” respiratorio.
- Sangrado severo
- Compromiso de órgano severo: AST o ALT mayor a 1,000 U/L. Sistema nervioso central: alteración de la conciencia. Compromiso del corazón u otro órgano.

De notar, la actualización de la guía del 2009 realizada en el 2015, retiró como signo de alarma el descenso rápido en el número de plaquetas ¹⁵.

3.9 PRINCIPALES CAMBIOS A LA GUIA DE LA OMS PARA DENGUE

En la guía propuesta por la OMS en 1997, se tienen en cuenta principalmente signos clínicos determinados por el médico a la hora de clasificar un caso de dengue, bien sea como DF, DHF, o como DSS; sin embargo, en la actualización propuesta en el 2009, se toman en cuenta síntomas referidos por el paciente (dolor abdominal y vómito persistente); Además, se incluye nuevos signos (hepatomegalia, acumulación de fluidos, letargia, inquietud). Estos últimos, fueron obtenidos de estudios realizados en pacientes de diferentes partes de América Latina y Asia, en los que se encontraron relacionados a progresión a severidad, siendo agrupado de una nueva categoría denominada dengue con signos de alarma.

Lo anterior, aumentó la sensibilidad de la clasificación del 2009 para la detección temprana de casos graves ³³, estrategia que disminuyó la mortalidad por dengue, pero a su vez, generó un incremento en las admisiones a los servicios de urgencias

para el seguimiento cercano de este grupo de pacientes, A pesar de las ventajas que presenta esta nueva clasificación, la nueva categoría de niños con signos de alarma, supone un reto a la hora de aplicarla en estudios inmunológicos, ya que este grupo que corresponde a la gran mayoría de individuos sintomáticos está conformado por signos y síntomas de diversos orígenes fisiopatológicos, y por demás inespecíficos, obtenidos a partir de análisis estadísticos que soportan su utilidad en estudios clínicos.

De igual forma, los casos graves de la clasificación revisada, pueden ser definidos por 3 entidades clínicas diferentes: fuga plasmática severa, sangrado intenso y compromiso severo de órgano; que si bien, todos comprometen la vida del paciente si no son manejados oportunamente, no tiene una fisiopatología común. Por lo tanto, la utilidad de la clasificación del 2009 en estas situaciones particulares no es conocida ¹¹⁻³⁴. En este mismo sentido desde tiempo atrás ha sido sugerido que las nuevas definiciones de caso en DSSA y DG, aunque muy útiles en estudios de vigilancia y reporte, puede no ser lo de igual manera para el avance en la identificación de factores relacionados con la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, pacientes con dengue pueden tener un sangrado profuso desde una ulcera duodenal previa y entrarían en shock. Por otro lado, pacientes con shock distributivo, tienen disfunción de órganos secundaria a la hipovolemia. Los dos tienen un origen y mecanismo desencadenante completamente diferente, pero en la guía revisada 2009, ambos casos serían incluidos dentro de un mismo grupo (Dengue grave). Por tanto, hay autores defienden la idea de clasificar la severidad de dengue según la presencia de hemorragia, fuga vascular y otros (más que como una común categoría agrupada en dengue grave).³⁵. Esto soporta de nuevo, la necesidad de datos que evalúen la utilidad de las clasificaciones de dengue en estudios fisiopatológicos.

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio observacional, analítico, ambispectivo, realizado en la Unidad de Infectología Pediátrica del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y la División de Inmunología de Facultad de Salud, Programa de Medicina de la Universidad Surcolombiana – Neiva, que tuvo una duración total de 24 meses.

4.2 POBLACION Y MUESTRA

Los sujetos de este estudio corresponden a 180 pacientes pediátricos, de entre 6 meses y 14 años de edad, que consultaron al servicio de urgencias del Hospital Universitario de Neiva y a la E.S.E. Carmen Emilia Ospina, entre enero del 2011 y diciembre del 2013, por cuadro clínico sospechoso de infección aguda por DENV (de 2-6 días desde el inicio de los síntomas, principalmente fiebre) y confirmación de la infección por detección de NS1, IgM DENV-específica en plasma o detección del genoma viral.

Durante las primeras 24h de visita al servicio de urgencias, una muestra de sangre total (volumen colectado fue ajustado al peso) en tubo que contenía anticoagulante (EDTA, Vacutainer, BD, USA) fue tomada. La sangre fue centrifugada a 200 g x 10 minutos y el plasma fue colectado y mantenido a -70°C, hasta que fue descongelado para su uso. Como grupo control se tomaron muestras de sangre periférica de estos mismos pacientes en fase de convalecencia que fueron citados un mes posterior al egreso del centro asistencial y se sometieron al procedimiento ya descrito para su conservación y posterior uso.

Durante su hospitalización a todos los niños le fueron tomados cuadro hemático con recuento de plaquetas y la gran mayoría de ellos, cuentan con tiempos de coagulación y enzimas hepáticas. La recolección de las muestras de plasma para uso en investigación fue aprobada por los acudientes de los niños y en pacientes mayores de 6 años, por los mismos niños, mediante el diligenciamiento de un consentimiento y asentimiento informado. El proceso de recolección y uso de muestras de plasma para el fortalecimiento del Biobanco del Grupo de Parasitología y Medicina Tropical fue aprobado por el comité de ética en investigación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

4.3 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR DENV

La infección por DENV fue confirmada en todos los niños incluidos por la presencia de IgM DENV-específica y/o de la proteína no estructural 1 (NS1), mediante el uso de un kit comercial de ensayo de inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA, ambos de Panbio, Australia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional fue también usado para el diagnóstico de la infección aguda en una fracción de los casos, mediante un ampliamente usado protocolo ³⁶.

4.4 DETECCIÓN DE CITOQUINAS

En todos los pacientes se determinó el nivel plasmático de IL-6 e IL-8 (previamente relacionadas a la patogénesis de la infección con DENV ³⁷). Para la detección de estas citoquinas, La División de Inmunología cuenta con un Citómetro de Flujo FACS Canto II. Todas las recomendaciones del fabricante fueron seguidas. Las concentraciones finales de las citoquinas fueron obtenidas usando el software FCAP v. 3.0.14 (BD. San José. USA).

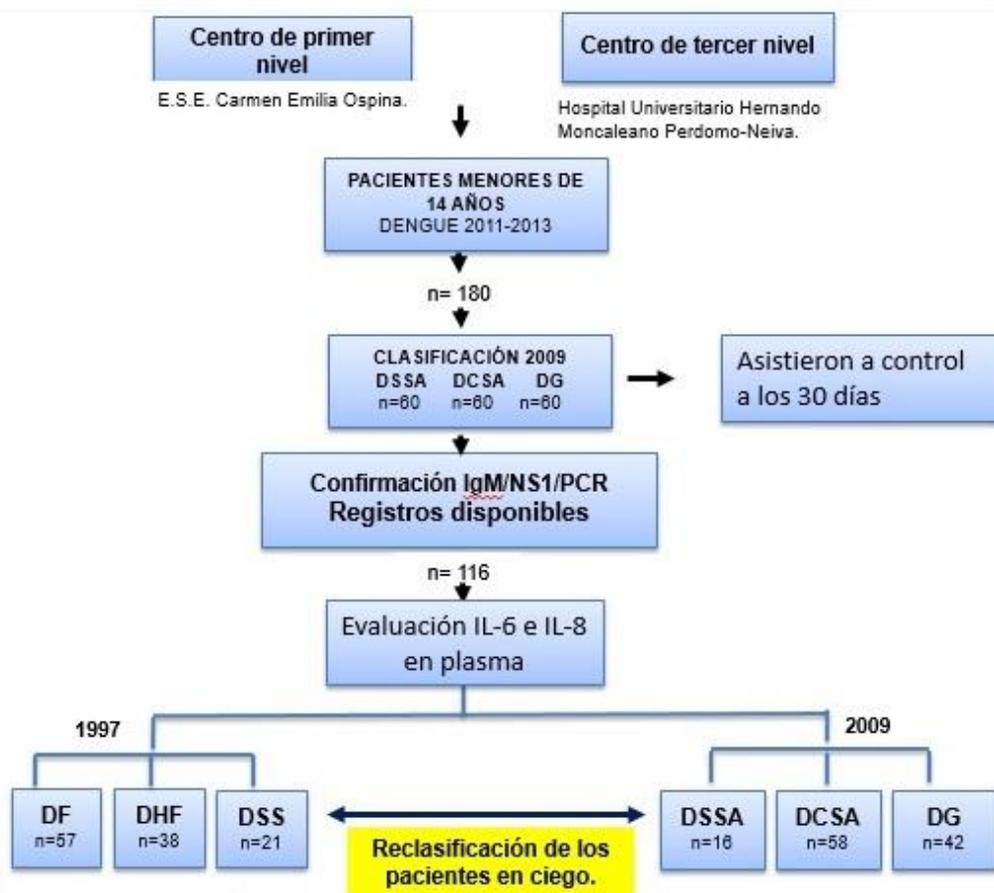
4.5 ANÁLISIS, CLASIFICACIÓN CLÍNICA Y MANEJO DE LA INFORMACIÓN

Se incluyeron muestras de pacientes que ingresaron con sospecha de Dengue de los cuales 180 tuvieron confirmación de la infección aguda mediante las pruebas diagnósticas ELISA IgM/NS1 para Dengue y PCR para la identificación del serotipo viral. Como criterios de inclusión en el estudio los niños debían tener registro médico con historia clínica completa en el archivo de pediatría del HUHMP. Este criterio fue cumplido por 116 de los 180 niños con infección confirmada por DENV. Se realizó un control clínico de seguimiento a los 30 días del egreso hospitalario en la Unidad de infectología pediátrica del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo obteniéndose una segunda muestra tomada por lo tanto en la fase convalecencia. De notar, esta segunda muestra en convalecencia simula en gran medida las condiciones observadas en condiciones basales o niños sanos (Castañeda DM and Narváez CF. *Virology*. 2017). Los 116 niños con infección confirmada por DENV y disponibilidad de registros clínicos fueron identificados usando la clasificación revisada 2009 (como recomendado por la guía nacional de atención de paciente con dengue del Ministerio de salud 2010), en niños con DSSA (n=16), DCSA (n=58) y DG (n=42), por dos pediatras con experiencia en Arbovirosis. Una vez clasificados a todos los pacientes incluidos se les evaluó en plasma los niveles de IL-6 e IL-8. Posterior a la medición de las citoquinas, los pacientes fueron reclasificados en ciego utilizando la guía de 1997 de la OMS por parte de dos pediatras entrenados

con experiencia en el campo. El diseño del trabajo realizado es mostrado en la Figura 1.

La información clínica y de laboratorio del estudio se obtuvo mediante la revisión documental individual y secuencial de los registros médicos que se consignaron en un instrumento de recolección de información (Ver anexo A), que agrupa las variables del presente estudio en 5 ítems: características clínicas, características de laboratorio, clasificación según la guía de la OMS 1997, clasificación según la guía de la OMS 2009 y parámetros inmunológicos (niveles de citoquinas circulantes). De allí, a su vez; se construyó una base de datos en Excel.

Figura 1. Diseño del estudio. Se representa de forma esquemática el estudio realizado a 116 pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de infección por DENV a quienes se les midieron las citoquinas IL-6 e IL-8 y fueron clasificados según las guías de la OMS de los años 1997 y 2009.



5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos fue realizado por medio del programa GraphPad Prism® 7.0 software para MAC (GraphPad Software, La Jolla, CA) y STATA v.20, usando pruebas no paramétricas. A las variables cuantitativas se les aplicó medidas de tendencia central y de dispersión, y a las variables cualitativas, análisis de frecuencias como Chi cuadrado.

Se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney (grupos independientes) y Wilcoxon (grupos pareados) para determinar las diferencias en los niveles de citoquinas circulantes entre los grupos clínicos | creados usando cada una de las dos clasificaciones. En todos los casos una $P < 0.05$ fue considerada como significativa. Finalmente, para determinar la sensibilidad y especificidad de los niveles de las citoquinas evaluadas e identificar los casos de dengue severo cuando son clasificados con una u otra clasificación, se construyó una curva ROC.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

En el presente estudio se analizaron 116 pacientes que asistieron a alguno de los dos centros de salud (E.S.E. Carmen Emilia Ospina y Hospital Universitario de Neiva) y de los cuales se contó con registro médico completo que proporcionara información clínica y epidemiológica. Cada uno de los sueros de los pacientes fue analizado para la medición de las concentraciones de IL-6 e IL-8 mediante el ensayo ya descrito. Posteriormente, los pacientes fueron clasificados según los criterios revisados de la OMS en el 2009 y posteriormente reclasificados en ciego con los criterios de 1997 para el análisis final.

Cada uno de los 116 pacientes fueron distribuidos teniendo en cuenta los parámetros indicados en la clasificación de 2009 donde 16 se ubicaron en DSSA, 58 pacientes en DCSA y 42 en DG, como es mostrado en la Tabla 1. Posteriormente, se realizó la reclasificación con los parámetros de 1997 en tres grupos donde 57 pacientes fueron incluidos como DF, 38 como DHF y 21 como DSS, este último grupo incluyó 3 pacientes que presentaron choque profundo y que por su baja frecuencia fueron incluidos en este grupo dentro de la respectiva clasificación.

Tabla 1. Características epidemiológicas, clínicas y paraclínicas de los pacientes.

Parámetros n=116		Clasificación 1997				Clasificación 2009 actualizada				
		DF n= 57	DHF n= 38	DSS n= 21	<i>p</i>	DSSA n= 16	DCSA n= 58	DG n=42	<i>p</i>	<i>p'</i>
Mujer (n,%)		24 (42%)	21 (55%)	11 (52%)	0,077 ^a	6 (37%)	29 (51%)	20 (47%)	0,023 ^a	0,3611 ^a
Hombre (n,%)		33 (57%)	18 (47%)	10 (47%)	0,530 ^a	10 (62%)	28 (50%)	22 (52%)	0,676 ^a	0,411 ^a
Edad (meses) (Mediana, rango)		72 (12-156)	78 (5-156)	62 (4-144)	0,580 ^b	66 (24-132)	72 (12-156)	72 (4-156)	0,892 ^b	0,605 ^b
Días de fiebre (Mediana, rango)		5 (2-10)	4.5 (3-6)	5 (2-7)	0,288 ^b	4.5 (2-10)	5 (3-7)	5 (2-6)	0,796 ^b	0,2273 ^b
Signos y síntomas	Vómito (n, %)	35 (61%)	26 (68%)	20 (95%)	0,0151 ^a	1 (6%)	42 (75%)	33 (78%)	<0,0001 ^a	<0,0001 ^a
	Dolor abdominal (n,%)	40 (70%)	18 (47%)	8 (38%)	0,014 ^a	9 (56%)	45 (80%)	10 (23%)	<0,0001 ^a	<0,0001 ^a
	Diarrea (n,%)	6 (10%)	12 (31%)	5 (23%)	0,036 ^a	2 (12%)	12 (21%)	9 (21%)	0,711 ^a	0,717 ^a
	Alteración de conciencia (n,%)	1 (2%)	0	1 (5%)	0,404 ^a	1 (6%)	0	1 (2%)	0,226 ^a	0,383 ^a
	Sangrado (n,%)	5 (8%)	7 (18%)	7 (33%)	0,031 ^a	0	8 (14%)	10 (23%)	0,077 ^a	0,148 ^a
Paraclínicos	Hematocrito % (Mediana, rango)	37 (31-56)	38 (27-46)	36 (11-51)	0,366 ^b	37 (33-40)	37 (27-56)	37 (11-43)	0,662 ^b	0,742 ^b

Leucocitos x 10 ³ cell/L (Mediana, rango)	5 (0,11- 14,5)	5,6 (1,7-23)	6,2 (2,1-14,5)	0,173 ^b	5 (2,1- 10,3)	5,4 (1,3-23)	5,6 (1,5-13,7)	0,572 ^b	0,377 ^b
Plaquetas x 10 ³ cell/L (Mediana, rango)	93 (14-325)	66 (9-440)	42,4 (12-118)	<0,0001 ^b	110 (30-277)	83,5 (14-325)	55 (9-440)	<0,0001 ^b	<0,0001 ^b
TP segundos (Mediana, rango)	14 (11-24)	15 (11-23)	17 (13-28)	0,0096 ^b	**	14 (11-24)	15 (11-23)	0,021 ^c	0,011 ^b
PTT segundos (Mediana, rango)	40 (25-93)	40 (13-78)	59 (28-180)	0,0002 ^b	**	39 (20-93)	48 (13-180)	0,01 ^c	0,0002 ^b
AST U/L (Mediana, rango)	133 (22-596)	181 (47-657)	58 (28-295)	0,002 ^b	**	144 (21-657)	196 (51-616)	0,002 ^c	0,0008 ^b
ALT U/L (Mediana, rango)	65 (9-341)	73 (18-306)	92 (18-287)	0,062 ^b	**	68 (9-381)	76 (18-287)	0,043 ^c	0,071 ^b
CPK-T U/L (Mediana, rango)	372 (3-3.700)	644 (30- 8.500)	834 (38- 8.100)	0,652 ^b	**	496 (3- 4.000)	674 (30- 8.500)	0,478 ^c	0,379 ^b
CPK-MB U/L (Mediana, rango)	48 (10-668)	32 (8-96)	49 (11-255)	0,699 ^b	**	45 (8-668)	37 (10-255)	0,718 ^c	0,690 ^b
Albumina mg/dL (Mediana, rango)	3,4 (2,5-4,2)	3,2 (2,4-4)	2,6 (1,8-3,3)	<0,0001 ^b	**	3,4 (2,5-4,2)	2,8 (1,8-3,9)	<0,0001 ^c	<0,0001 ^b

	Glicemia mg/dL (Mediana, rango)	94 (55- 123)	102 (77-153)	93 (55-134)	0,534 ^b	**	95 (55-149)	103 (55-153)	0,0112 ^c	0,078 ^b
--	--	-----------------	-----------------	----------------	--------------------	----	----------------	-----------------	---------------------	--------------------

^a *Chi square test*

^b *Kruskal-wallis test*

^c *Mann-Whitney test*

p: Análisis estadístico entre todos los grupos de las dos clasificaciones. ** Información no conocida en dicho grupo de pacientes, TP: Tiempo de protrombina, PTT: Tiempo de tromboplastina, AST: , ALT: , CPK-T:, CPK-MB: , U/L: Unidades por Litro, mg/dL: Miligramos por decilitro.

Al clasificar y analizar las variables encontramos que la frecuencia de mujeres fue inferior en la clasificación de DSSA en comparación con los otros grupos mientras que los hombres se ubicaron de forma similar en cada una de las categorías. En cuanto a las variables clínicas, aunque el vómito persistente es un signo de alarma según la clasificación de 2009 y no se tiene en cuenta en ningún otro grupo, éste estuvo presente como episodios aislados en más del 50% de los pacientes y casi en la totalidad de los DSS. Sólo una persona ubicada como DSSA manifestó el síntoma.

Como era de esperarse, el dolor abdominal fue característico en los pacientes con DCSA y curiosamente, cerca del 56% de los niños clasificados como DSSA refirieron dicho síntoma. Cuando se reclasifican, la mayoría de pacientes del grupo DF habían presentado este síntoma, resultado esperado ya que en 1997 la forma más leve de la enfermedad incluiría los casos de alarma de 2009, es de anotar que en la clasificación de 1997 presenta una p estadísticamente significativa para este aspecto. La diarrea fue más frecuente en el grupo DHF (Tabla 1) y el sangrado fue significativamente mayor en los pacientes ubicados en los grupos de mayor severidad de cada clasificación (DSS para 1997 y DG para 2009).

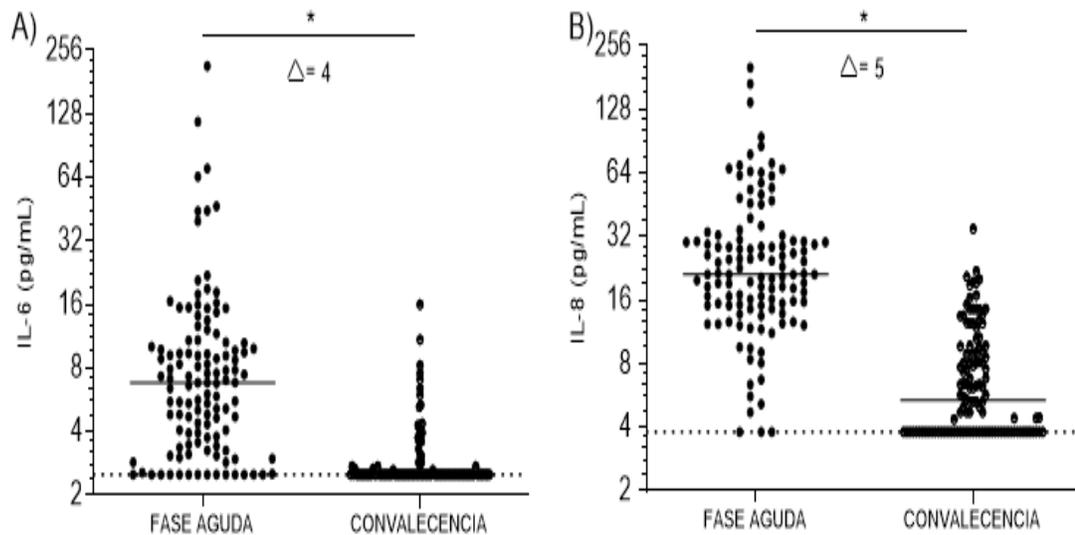
En cuanto a los paraclínicos, aunque el descenso rápido de plaquetas no es determinante para la clasificación de los pacientes, se observó una disminución importante en el recuento plaquetario de los pacientes clasificados como DSS y DG. Así mismo, todos los grupos mostraron tiempos de coagulación prolongados (PT y PTT) ubicando los valores más prolongados en los mismos grupos de severidad donde la trombocitopenia fue mayor (Tabla 1). Las enzimas hepáticas estuvieron elevadas en todos los grupos, sin embargo; en la clasificación de 2009 la AST se incrementó principalmente en la presentación más grave (DG) mientras que en 1997 el mayor incremento se ubicó en el grupo DHF y la ALT tuvo mayor ascenso en los grupos más severos de ambas clasificaciones.

En conclusión y como se esperaba, variables como el dolor abdominal, el vómito y la AST no fueron comparables entre 1997 y 2009 para identificar los casos severos de las formas leves ya que varía en cada clasificación. Por el contrario; la trombocitopenia estuvo presente en los grupos más graves de ambos años al igual que los tiempos de coagulación más prolongados; por lo que se podría replantear que la clasificación actual volviera a tener en cuenta una disminución importante en el recuento plaquetario como criterio de clasificación. Estos resultados apoyan la idea de la adecuada aplicación de cada una de las clasificaciones durante el estudio.

6.2 INFECCIÓN POR DENV EN NIÑOS, INDUCE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN PLASMA

Inicialmente se quiso determinar si la infección por DENV induce cambios en los valores plasmáticos de citoquinas pro inflamatorias circulantes. Para esto, los niveles de IL-6 e IL-8 fueron evaluados por un ensayo basado en micro esferas y citometría de flujo. Al clasificar las muestras según la fase de la enfermedad obtuvimos que la infección con DENV incrementa hasta 5 veces el nivel de ambas citoquinas durante la fase aguda de la infección cuando es comparada con el periodo de convalecencia, como se observa en la Grafica 1.

Grafica 1. Niveles plasmáticos de IL-6 (A) e IL-8 (B) obtenidos durante la fase aguda, son significativamente mayores en comparación con la fase de convalecencia.

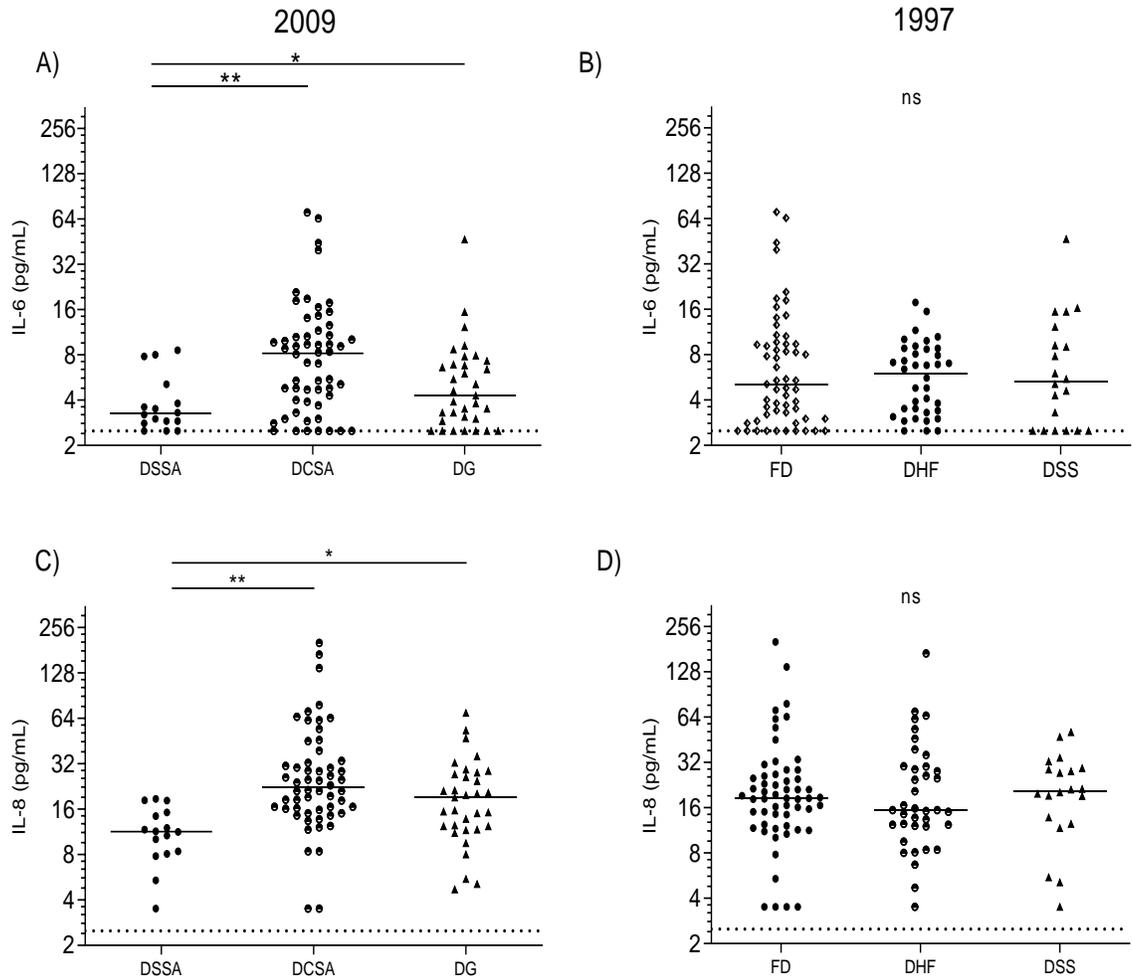


La línea punteada indica el límite de sensibilidad del ensayo. El asterisco representa diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($P < 0.0001$) con la prueba Wilcoxon. $\Delta = A/C$ (niveles de incremento los niveles de citoquinas entre la fase aguda y la convalecencia)

6.3 PATRÓN DE IL-6 E IL-8 EN PLASMA OBTENIDO CUANDO LA CLASIFICACIÓN 2009 Y 1997 SON USADAS

Posterior al análisis de las concentraciones en la fase de la infección, se pretendió establecer si el patrón y los niveles de estas dos citoquinas variaban dependiendo de la clasificación usada y si éstos valores se relacionaban con la severidad clínica establecida en cada una de las dos clasificaciones de la infección. Como mostrado en la Grafica 2, los niveles tanto de IL-6 como de IL-8 fueron bajos en el grupo sin signos de alarma de la clasificación de 2009, mientras que para los grupos Dengue con signos de alarma y Dengue Grave los niveles fueron significativamente superiores, lo que permite relacionar estos respectivos biomarcadores con la severidad de la enfermedad *in vivo*. Sin embargo, al analizar los niveles de las citoquinas según la clasificación de 1997 no se obtuvieron diferencias, como mostrado en la Grafica 2. Los anteriores hallazgos indican que la clasificación de 2009 permitiría relacionar las concentraciones de IL-6 e IL-8 con la severidad del cuadro clínico.

Grafica 2. Distribución de los valores de IL-6 e IL-8 plasmática en los pacientes divididos usando las clasificaciones de 1997 y 2009.



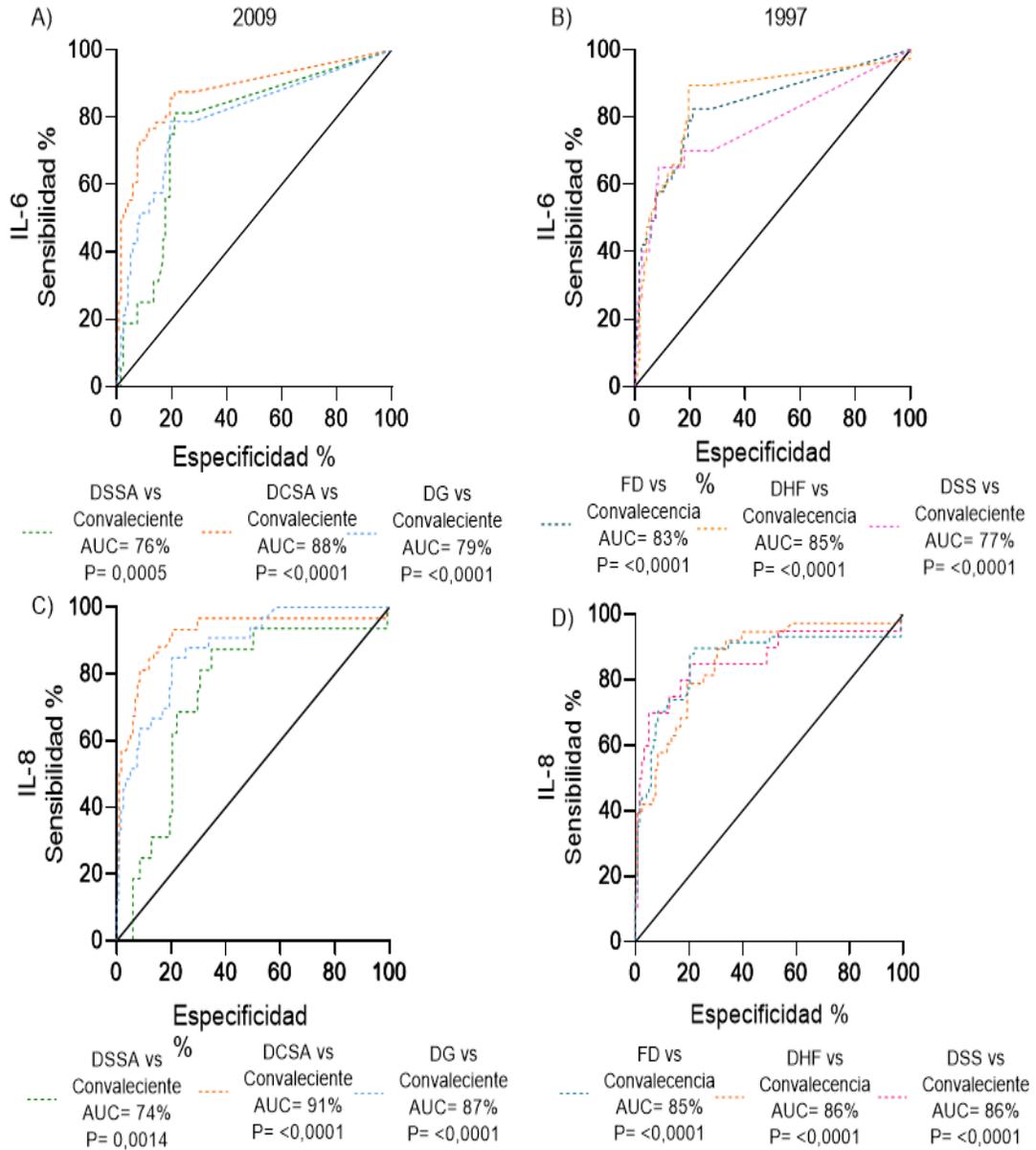
Los niveles de IL-6 e IL-8 fueron evaluados en los mismos pacientes separados según la clasificación clínica de la infección por DENV en 2009 y 1997, (a-c) y (b-d), respectivamente. Para la clasificación de 2009 se encontraron niveles elevados de IL-6 e IL-8 en los grupos de mayor severidad ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) y bajas concentraciones en el grupo Dengue sin signos de alarma ($P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). Mientras que para la clasificación de 1997 no se encontraron diferencias (ns).

6.4 UTILIDAD DE NIVELES DE IL-6 E IL-8 PARA IDENTIFICAR GRAVEDAD CLÍNICA DEPENDIENDO DE LA CLASIFICACIÓN USADA

Luego de evaluar la relación entre los niveles de las citoquinas con cada una de las clasificaciones, se decidió establecer la utilidad de ellas en la identificación de cada una de las categorías clínicas presentadas por los pacientes. Para esto se usaron como punto de comparación los niveles obtenidos en fase de convalecencia en comparación de los valores de las respectivas citoquinas obtenidas en fase de aguda para los niños divididos según cada una de las clasificaciones y así construir una curva ROC.

Inicialmente se observó que los niveles tanto de IL-6 como de IL-8 en plasma ayudan a discriminar pacientes enfermos en fase aguda de la fase convaleciente independientemente de la clasificación usada pues el AUC de cada grupo siempre fue superior al 70% con diferencias estadísticamente significativas (Grafica 3). Por lo tanto, como se puede observar en la Grafica 3, los niveles de IL-6 (A-B) e IL-8 (C-D) permiten identificar con un alto poder, pacientes enfermos divididos usando ambas clasificaciones.

Grafica 3. Curva ROC IL 6 e IL 8 clasificación Dengue 2009 y 1997. IL6 e IL-8 como marcadores de severidad en Dengue según las clasificaciones de los años 2009 (A-C) y 1997 (B-D).

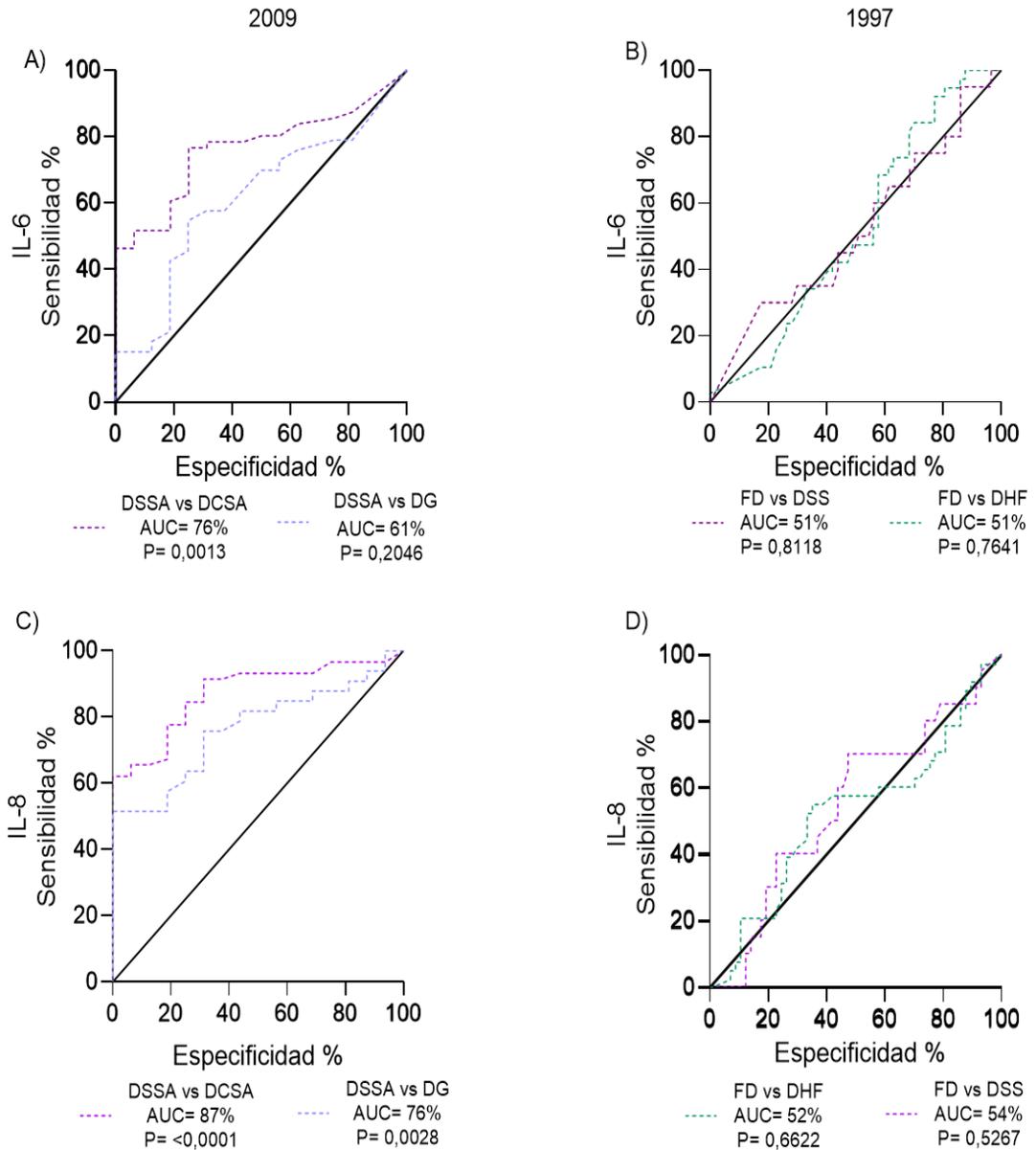


El área bajo la curva (AUC, en inglés) y los valores de P son mostrados al comparar cada uno de los grupos vs. la fase convaleciente como indican los colores.

Posteriormente se determinó si estas citoquinas son útiles para discriminar dentro de los pacientes agudamente infectados, a aquellos con mayor grado de severidad. Se encontró que la IL-6 e IL-8 ayudan a discriminar pacientes con DSSA de los pacientes DCSA pues las curvas generadas para cada una muestran AUC de 76% con $P= 0.0013$ y para IL-8 AUC de 87% y $P<0.0001$ (Grafica 4). La IL-8 (pero ni la IL-6) además, logró identificar pacientes graves de aquellos sin signos de alarma cuando la clasificación 2009 fue usada (AUC: 76%, $P=0.002$). Sin embargo, los valores obtenidos con la clasificación de 1997 entre los diferentes grados de severidad, no superaron el 54% del AUC para la IL-6 o IL-8 plasmáticas (Grafica 4). Lo anterior indica que los niveles de IL-6 e IL-8 podrían ser de utilidad clínica sirviendo como biomarcadores que ayudan a discriminar entre los diferentes grados de severidad con la clasificación de 2009, pero no contribuye a diferenciar los casos más severos con la clasificación de 1997.

En definitiva, la medición de las citoquinas evaluadas en este estudio contribuye de manera significativa como posible biomacador asociado a severidad al asociarse con la clasificación de 2009.

Grafica 4. Curva ROC IL 6 e IL 8 entre los grupos de las clasificaciones Dengue 2009 y 1997. IL6 e IL-8 como marcadores de severidad en Dengue para la clasificación de 2009 (A-C)



Donde se discrimina el DSSA de los grupos DCSA y DG, mientras que la distribución de 1997 no muestra asociación con la gravedad. El área bajo la curva (AUC, en inglés) y los valores de P son mostrados al comparar cada uno de los grupos vs. la fase convaleciente como indican los colores.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones que tenemos en nuestro estudio es el sesgo de información debido a que los datos clínicos obtenidos son fuente subjetiva de la madre frente a los síntomas del paciente y condicionaría a errores en la clasificación del dengue. Se podría incurrir también en sesgos de selección debido a que la misma se basa a la calidad de la información de la historia clínica.

7.1 FONDOS

Este proyecto fue financiado por la Universidad Surcolombiana, convocatoria de menor cuantía 2019 (Proyecto #3025-2018) y fue aceptado para presentación en modalidad de póster en Pan American Dengue Research Meeting en Lima, Perú 2020.

8. DISCUSION

La infección por el virus del dengue continúa siendo una enfermedad de importancia epidemiológica ocasionando alrededor de 100 millones de casos de enfermedad cada año (OMS). Los principales avances en investigación están basados en el perfil inmunológico, desarrollo en vacunas y prevención, revelando nuevos conocimientos y permitiendo nuevas intervenciones y enfoques para el control del dengue.

La clasificación de dengue de 1997 fue realizada tomando en cuenta el mecanismo patogénico, sin embargo, debido a su limitada utilidad en la predicción de los casos que progresan a formas severas, en 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de un consenso de expertos, hace una revisión y recomienda el uso de una nueva clasificación pero su utilidad en estudios que analizan factores inmunes en la fisiopatología de la enfermedad no es aún claro; por lo tanto se aplicaron las 2 clasificaciones en este estudio.

Uno de los principales intereses a nivel mundial es destacar las aplicaciones y el interés por tener herramientas clínicas útiles para clasificar los pacientes de riesgo elevado y con criterios de remisión que mejoraran las tasas de mortalidad en dengue. Una publicación de 2013 señala las ventajas de la clasificación revisada: Primero, enfatiza la enfermedad como trifásica, por lo cual los clínicos se ven obligados a observar a sus pacientes de cerca, día a día, por el apareamiento de los signos de alarma, hasta que la fase crítica haya culminado. Segundo, la guía del 2009 remarca que los pacientes sin signos de alarma pueden desarrollar dengue grave, lo cual puede ser fulminante e impredecible. Tercero, la clasificación revisada ayuda en la vigilancia epidemiológica.³⁸ Cuando se observa la distribución de los grupos de riesgo en nuestro trabajo, para la misma población cuando se aplican las dos clasificaciones el 24% cumplía criterios para FDH comparada con el 40 % con criterios para dengue con signos de alarma (Tabla 1), aumentando la sensibilidad y posibilidad de detectar los pacientes que requieren manejo hospitalario.

La comprensión de la fisiopatología de la enfermedad se ha visto limitada debido a que no existen modelos eficaces que generen una respuesta celular y humoral similar a la respuesta en el ser humano que ayude a entender la complejidad y las interacciones entre los factores solubles y la respuesta celular. En nuestros hallazgos fue posible identificar en los grupos de mayor severidad los recuentos plaquetarios más bajos de todos los grupos analizados, así como prolongación en los tiempos de coagulación. Estos resultados concuerdan con la presentación de la enfermedad pues tiene como características distintivas de la fisiopatología en los casos más complicados fuga vascular y hemorragia, que se explican en parte por

un aumento de la expresión sistémica de citoquinas.³⁹

Los mediadores biológicos que han sido implicados en la patogénesis del dengue a partir de varios estudios han reportado resultados contradictorios. El diseño distintivo del estudio, el momento de la recolección de la muestra, el procesamiento de la muestra y las poblaciones del estudio probablemente contribuyan a estos resultados contradictorios, pero también se debe considerar la posibilidad de que diferentes vías puedan producir manifestaciones clínicas similares.³⁷ En nuestro estudio se tomaron niveles plasmáticos de citoquinas (IL-6, IL-8) en fase aguda y de convalecencia para evaluar la respuesta inmunológica en niños con infección por DENV en el periodo evaluado observándose una respuesta estadísticamente significativa (Grafica 1) en sus valores para las dos citoquinas, consistente con lo reportado en la literatura.⁴⁰ Otros estudios han evaluado la infección por DENV *in vitro* utilizando varios tipos de células han aclarado los mecanismos de replicación viral y evasión inmune. Estos estudios también han demostrado que la interacción entre DENV y las células hospedera da como resultado la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias, pues los macrófagos infectados con DENV y las células endoteliales producen IL-8, un efecto mediado por las proteínas DENV NS5 y NS4B.⁴¹ Adicionalmente, en modelos murinos se encontró que las células endoteliales infectadas con DENV también secretaron IL-6, CXCL10, CXCL11 y RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted).⁴²

Según los hallazgos mostrados aquí, el incremento de IL-6 e IL-8 se asocia a los casos de mayor gravedad (DCSA y DG) diferenciándolos de los casos leves (DSSA) de la clasificación de 2009 pero no resultan útiles cuando los pacientes son clasificados con los criterios de 1997 (Grafica 2), probablemente debido a que el grupo DF incluye pacientes con criterios que para 2009 son considerados como graves. Esto es corroborado por un estudio donde reportaron que los niveles séricos de IL-6 se asocian con la forma más severa de la clasificación de 2009 (DG).²⁵ Aunque algunos estudios han descrito que estas citoquinas también se asocian a los casos más severos (DHF y DSS) de la clasificación de 1997.²⁴⁻⁴³, ningún estudio ha comparado ambas clasificaciones reclasificando los pacientes, como se hizo en este estudio, por lo tanto, se considera que al menos, la medición de IL-6 e IL-8 se puede relacionar con una mayor patología usando la clasificación de 2009 y que esta clasificación es útil en estudios inmunes que involucran citoquinas.

Encontrar un marcador biológico con títulos que guarden una relación directa con base en la gravedad del dengue puede proporcionar pistas sobre los mecanismos de las manifestaciones graves del dengue, especialmente la fuga de plasma y el sangrado, pues hasta el momento las manifestaciones clínicas son las únicas características utilizadas para predecir la gravedad de la enfermedad del dengue (OMS). En nuestro estudio se analizó el rendimiento de los niveles de IL 6 e IL8 para

predecir severidad del dengue de acuerdo a la clasificación de 1997 y la revisada de 2009 (Grafica 3) en donde se observó un rendimiento adecuado con AUC superior a 80% para las dos clasificaciones tomando como punto de comparación los niveles de citoquinas de los pacientes en fase de convalecencia. Es decir, es posible discriminar los casos de Dengue de los controles (Dengue convaleciente). Así mismo, encontramos que es posible diferenciar entre los grupos Dengue clasificación revisada de 2009 pero no con la de 1997, pues la IL-6 discrimina el grupo DCSA del DSSA (Grafica 4), mientras que la IL-8 discrimina las dos formas de mayor severidad (DCSA y DG) de la presentación más leve de la enfermedad (DSSA) (Grafica 4).

9. CONCLUSIONES

Existe gran interés por comprender de manera clara como interaccionan los factores inmunológicos en los desenlaces clínicos de los pacientes críticos. Para ello, se plantea un mejor análisis del curso clínico relacionado a los eventos fisiopatológicos con la clasificación de OMS de 2009 por lo que se ha utilizado para plantear hipótesis y realizar los esquemas metodológicos en diferentes publicaciones.

Según los resultados, los niveles de IL-6 e IL-8 se asocian con la severidad de la infección y pueden ser de utilidad clínica para discriminar las formas graves de las leves usando la clasificación del 2009. Además, la aplicación clínica de esta clasificación ha contribuido positivamente en el manejo oportuno y mortalidad de los pacientes.

Por el momento continua el interés en determinar y comprender a cabalidad los eventos tanto clínicos como fisiopatológicos que pueden modificarse en pro de la mejoría de la atención de los pacientes con infección por dengue siendo necesarios más estudios similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
2. Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(12):745–59.
3. Pang J, Lindblom A, Tolfvenstam T, Thein TL, Naim ANM, Ling L, et al. Discovery and validation of prognostic biomarker models to guide triage among adult dengue patients at early infection. *PLoS One*. 2016;11(6):1–19.
4. Cunningham R, Mutton K. Dengue haemorrhagic fever. *Bmj*. 1991;302(6784):1083–4.
5. WHO. DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL. Vol. 409, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Dengue: 2009. 160 p.
6. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):271–81.
7. Andrade S De, Herkert, CMM, RV Cunha, MD Rodrigues BS. A New Approach to Reducing Mortality from Dengue. *Open J Clin* 2014;4(March):12–6.
8. Horstick O, Martinez E, Guzman MG, San JL, Ranzinger SR. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. 2015;19–25.
9. Macedo GA, Gonin MLC, Pone SM, Cruz OG, Nobre FF, Brasil P. Sensitivity and specificity of the World Health Organization dengue classification schemes for severe dengue assessment in children in Rio de Janeiro. *PLoS One*. 2014;9(4).
10. Prasad D, Kumar C, Jain A, Kumar R. Accuracy and applicability of the revised WHO classification (2009) of dengue in children seen at a tertiary healthcare facility in northern India. *Infection*. 2013;41(4):775–82.
11. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons R V., Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue-how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011;53(6):563–7.
12. Guerrero CD, Arrieta AF, Ramirez ND, Rodríguez LS, Vega R, Bosch I, et al. High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe

forms of pediatric dengue. *Cytokine*. 2013;61(3):766–71.

13. Pozo-Aguilar JO, Monroy-Martínez V, Díaz D, Barrios-Palacios J, Ramos C, Ulloa-García A, et al. Evaluation of host and viral factors associated with severe dengue based on the 2009 WHO classification. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 Dec 11 [cited 2020 Jan 29];7(1):590. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-014-0590-7>

14. Zambrano P. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Dengue. *Inst Nac Salud*. 2014;(3):1–24.

15. OPS/OMS. Guías para la atención de enfermos en la región de las américas. 2015.

16. Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res*. 2013;98(3):423–31.

17. Mangione JNA, Huy NT, Thi N, Lan P, Mbanefo EC. The Association of Cytokines with Severe Dengue in Children. 2014;42(4):137–44.

18. Soe HJ, Yong YK, Al-obaidi MMJ, Raju CS, Gudimella R, Manikam R, et al. Identifying protein biomarkers in predicting disease severity of dengue virus infection using immune-related protein microarray. 2018;

19. Perdomo-Celis F, Salgado DM, Narváez CF. Selective dysfunction of subsets of peripheral blood mononuclear cells during pediatric dengue and its relationship with clinical outcome. *Virology*. 2017;507(February):11–9.

20. Huang J, Liang W, Chen S, Zhu Y, Chen H, Mok CKP, et al. Serum Cytokine Profiles in Patients with Dengue Fever at the Acute Infection Phase. *Dis Markers*. 2018;2018.

21. Kurane AI. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007;30:329–40.

22. Mangada MM, Rothman AL. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4 + T Cells to Heterologous Serotypes. *J Immunol*. 2005;175:2676–83.

23. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Vol. 1813, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2011. p. 878–88.

24. Bethell DB, Flobbe K, Phuong CXT, Day NPJ, Phuong PT, Buurman WA, et al.

Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis*. 1998 Mar;177(3):778–82.

25. Masood KI, Jamil B, Rahim M, Islam M, Farhan M, Hasan Z. Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in dengue disease severity. *Iran J Microbiol*. 2018 Jun 1;10(3):202–7.

26. Butthep P, Chunchakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12).

27. Kanwal F, Lu C, Qadri I, Sohail M, Farooqi Z-U-R. Interleukin-6: A promising disease severity index for dengue virus infection *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. *Asian Pac J Trop Dis* [Internet]. 2017 [cited 2020 Jan 19];7(5):266–9. Available from: <http://www.apjtc.com>

28. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. Vol. 307, *FEBS Letters*. 1992. p. 97–101.

29. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Escobar Gutierrez A, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*. 2004 Jul;85(7):1801–13.

30. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*. 1998 Nov;56(3):280–5.

31. Cabezas S, Bracho G, Aloia A, Adamson P, Bonder C, Smith J, et al. Dengue virus induces increased activity of the complement alternative pathway in infected cells. *J Virol*. 2018;6(33).

32. Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. 2018;(January):1–30.

33. Cavalcanti LP de G, Braga DN de M, Pompeu MM de L, Lima AAB, da Silva LMA, Aguiar MG, et al. Evaluation of the world health organization 2009 classification of dengue severity in autopsied individuals, during the epidemics of 2011 and 2012 in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):658–64.

34. Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):1–8.

35. Halstead SB. Paediatrics and International Child Health Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Heal* ISSN. 2012;2046–9055.
36. Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G-J. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):545–51.
37. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. 2017;
38. Huang CH, Kuo LL, Yang KD, Lin PS, Lu PL, Lin CC, et al. Laboratory diagnostics of dengue fever: An emphasis on the role of commercial dengue virus nonstructural protein 1 antigen rapid test. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013 Oct;46(5):358–65.
39. Guzman MG, Harris E. Dengue. In: *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2015. p. 453–65.
40. Tolfvenstam T, Lindblom A, Schreiber MJ, Ling L, Chow A, Ooi EE, et al. Characterization of early host responses in adults with dengue disease. *BMC Infect Dis*. 2011 Aug 2;11.
41. Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomodulators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology*. 2012 Jan 20;422(2):326–37.
42. Dalrymple NA, Mackow ER. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Jan 29];86(12):6408–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496214>
43. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* [Internet]. 1998 Nov [cited 2020 Jan 27];56(3):280–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783699>