

**Sistema General de Regalías  
Regalías para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación**

**Proyecto 2  
“Vigilancia y dinámica del virus del dengue como herramienta para la predicción y  
prevención de epidemias”**

**Programa  
“AEDES - Abordando áreas endémicas de dengue para la disminución de su  
impacto en la sociedad”**

**Investigador principal: FRANCISCO JAVIER DIAZ<sup>1</sup>**

**Coinvestigadores: RAQUEL OCAZONEZ<sup>2</sup>  
JAIRO MENDEZ RICO<sup>3</sup>**

**Investigadores Asociados: MAURICIO CORREDOR RODRIGUEZ<sup>1</sup>  
MARTA CECILIA OSPINA<sup>4</sup>  
OMAR GEOVANNY PEREZ ORTIZ<sup>5</sup>**

**Consultor Nacional: GLORIA REY BENITO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Universidad de Antioquia

<sup>2</sup> Universidad Industrial de Santander

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Salud

<sup>4</sup> Secretaria de Salud y Protección Social de Antioquia

<sup>5</sup> Universidad de Pamplona, Norte de Santander

## TABLA DE CONTENIDO

1. TITULO .....	3
2. RESUMEN EJECUTIVO.....	3
3. PALABRAS CLAVE.....	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD .....	5
5. JUSTIFICACIÓN .....	9
6. OBJETIVOS .....	11
7. MARCOS DE REFERENCIA.....	11
8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA.....	17
9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O AREA TERRITORIAL BENEFICIADA	18
10. METODOLOGÍA.....	18
11. PRODUCTOS.....	25
12. RESULTADOS .....	26
13. IMPACTOS.....	27
14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN .....	27
15. CRONOGRAMA POR FASES .....	28
16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES .....	29
17. BIBLIOGRAFÍA.....	30

## 1. TITULO

Programa: "AEDES - Abordando Áreas Endémicas de Dengue para la disminución de su impacto en la Sociedad"

Proyecto: "Vigilancia y dinámica del virus del dengue como herramienta para la predicción y prevención de epidemias"

## 2. RESUMEN EJECUTIVO

El dengue es una enfermedad infecciosa aguda que puede cursar como una enfermedad autolimitada pero altamente incapacitante o como una enfermedad severa y potencialmente fatal que requiere atención inmediata de alta complejidad. La enfermedad es transmitida por mosquitos del género *Aedes*. En las últimas décadas el dengue se ha expandido geográficamente al mismo tiempo que su severidad ha ido en aumento hasta convertirse en una de las prioridades en la salud pública.

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus del dengue (DENV), el cual se presenta en cuatro diferentes serotipos y varios genotipos dentro de cada serotipo. La infección por un serotipo no genera inmunidad duradera contra los otros; más aún, puede sensibilizar al individuo para desarrollar cuadros clínicos más severos en el futuro, cuando otros serotipos lo infecten. También existen diferencias en el riesgo de desenlaces clínicos severos dependiente del serotipo y el genotipo viral. Por lo anterior, el riesgo de enfermar, de necesitar tratamiento hospitalario y de morir por dengue está determinado, en gran medida, por la identidad de los serotipos y genotipos que circulan en un sitio dado y por la inmunidad poblacional derivada de la infección anterior por algún serotipo.

Dependiendo del tamaño de la población afectada, el dengue puede presentarse en forma epidémica o endemo-epidémica. La forma epidémica se observa más frecuentemente en poblados o pequeñas ciudades en las que un brote aparece súbitamente, dura de semanas a meses, y luego desaparece completamente al agotarse la población susceptible. En este contexto se ha demostrado que las epidemias suele ir precedidas varios meses antes por la introducción de un nuevo serotipo viral. Se ha demostrado que la detección de esta introducción por un sistema eficiente de vigilancia de los virus circulantes puede servir como sistema de alerta temprana de las epidemias y potencialmente como un medio de prevenirlas o atenuarlas, siempre y cuando la detección del nuevo serotipo se siga de medidas eficaces para controlar el vector.

En las grandes ciudades, se presenta la forma endemo-epidémica caracterizada por la presencia permanente de casos y epidemias con intervalos de 3 a 5 años. Es frecuente la circulación persistente de más de un serotipo viral, condición denominada hiperendemicidad. El tamaño mínimo de la población para mantener una circulación viral permanente se estima entre 300.000 y 1.000.000 de habitantes. En estas circunstancias también se han observado cambios en la población de virus circulantes como fluctuación en el serotipo predominante, desplazamiento de un genotipo por otro y aumento en la diversidad genética con 5 a 8 meses de antelación a la epidemia. Esto sugiere que, en condiciones de hiperendemicidad, también se podrían anticipar las epidemias, aunque

aún no haya ejemplos que lo demuestren, principalmente porque estos cambios se suelen detectar con posterioridad a la epidemia.

En este proyecto se propone implementar un sistema de vigilancia de los virus circulantes y evaluar su eficacia para anticipar epidemias de dengue. El sistema operaría en 5 ciudades de Colombia, seleccionadas por ser potenciales puertas de entrada de los virus o por ser ciudades en situación de hiperendemicidad. Además se pretende refinar el potencial predictivo de dicho sistema integrándolo a una medición de la susceptibilidad a la infección en una población escogida como centro piloto. Adicionalmente se pretende describir con detalle la dinámica de aparición, diseminación, persistencia o extinción de las cepas virales.

La metodología a utilizar combina métodos de laboratorio tradicionales como el aislamiento viral y las pruebas serológicas inespecíficas y específicas de serotipo, con los estudios de la secuencia genética del virus. Estos últimos permiten, mediante el análisis filogenético y filodinámico, identificar los genotipos virales y describir en detalle el origen, las rutas de dispersión, las expansiones y contracciones de las poblaciones virales y el destino final de las cepas o linajes virales. Además el estudio genético permitiría identificar posibles polimorfismos genéticos que se convertirían en marcadores y determinantes de la severidad de la infección.

Como producto terminal de este proyecto se pretende formular un modelo predictivo del comportamiento clínico y epidemiológico del dengue en Colombia. Dicho modelo, al ser alimentado con los datos generados por la vigilancia del virus, los estudios de inmunidad poblacional y la vigilancia epidemiológica convencional, le permitiría a las autoridades de salud planear y desarrollar oportunamente sus programas de control de la enfermedad.

## **EXECUTIVE SUMMARY**

Dengue is an acute infectious disease that may occur as a self-limited but highly disabling illness, or as a severe and potentially fatal disease that requires immediate, high complexity medical care. The disease is transmitted by *Aedes* mosquitoes. In recent decades, dengue has geographically spread and has grown in severity to become one of the priorities in public health.

The etiologic agent of this disease is dengue virus (DENV), which comes in four different serotypes and several genotypes within each serotype. Infection with one serotype does not produce lasting protection against the others. Indeed, it may sensitize the individual to develop more severe clinical symptoms in the future, when infected by other serotypes. There are also differences in the risk of severe clinical outcomes depending on the viral serotype and genotype. Therefore, the risks of becoming ill, need hospitalization and die is largely determined by the identity of the serotypes and genotypes circulating and by the population immunity derived from previous infections with dengue serotypes.

Depending on the size of the affected population dengue can occur in epidemic or endemic-epidemic forms. The epidemic one is more often seen in villages or small towns where outbreaks begin suddenly, lasts for weeks to months, and then disappears completely when the susceptible population is exhausted. In this context it has been shown that epidemics are usually preceded by several months by the introduction of a new

serotype. It has been demonstrated that detection of this introduction by an efficient system of virological surveillance can serve as an early warning system for epidemics, and potentially, as a means to prevent or mitigate them, provided that the detection of the new serotype be followed by effective and opportune vector control measures.

The endemo-epidemic form, characterized by permanent presence of cases and epidemics every 3 to 5 years, is more common in large cities. The persistent circulation of more than one serotype, referred as hyperendemicity, is common in these conditions. The minimum population required to sustain circulation is estimated between 300,000 and 1,000,000. Changes in the viral population as fluctuation in the predominant serotype, genotype shift or increased genetic diversity have also been observed 5 to 8 months before the epidemics in these circumstances. This suggests that, in hyperendemic conditions, epidemics could also be anticipated, although examples demonstrating their prevention are lacking, mainly because these changes are usually detected after the epidemic.

This project proposes to implement a surveillance system of circulating viruses and to evaluate its effectiveness in anticipating dengue epidemics. The system would operate in 5 cities in Colombia, selected because being potential gateways for viruses or because they are in condition of hyperendemicity. It also intends to refine the predictive potential of this system measuring of the susceptibility to infection in a population selected as pilot site. Additionally, we intend to describe the dynamics of emergence, spread, persistence or extinction of the viral strains in detail.

The proposed methodology combines traditional laboratory methods like viral isolation and serotype-specific and nonspecific serological tests, with the study of the genetic sequence of the virus. The latter allows, through phylogenetic and phylodynamic analyses, the identification of viral genotypes, and a detailed description of the origin, dispersal routes, expansions and contractions of viral populations and the fate of viral strains or lineages. Furthermore, the study would identify potential genetic polymorphisms that could become markers and/or determinants of severity.

The ultimate aim of this project is to develop a predictive model of the clinical and epidemiological behavior of dengue in Colombia. After being fed with data generated by the surveillance of the virus, population immunity surveys and conventional epidemiological surveillance, this model would allow health authorities to plan and develop timely programs of disease control.

### **3. PALABRAS CLAVE**

Dengue, serotipo, genotipo, inmunidad, filogenia, predicción.

### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA O NECESIDAD**

El virus del dengue (VDEN) es de capsida icosaédrica rodeada por una envoltura lipoproteína y el genoma es una molécula de RNA con un único marco de lectura limitado

en cada extremo por secuencias no-codificantes. El marco de lectura contiene la secuencia nucleotídica para 10 proteínas en el siguiente orden: NH<sub>2</sub>-5'NC-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'NC-COOH. La proteína E está embebida en la envoltura y expuesta de manera que media la interacción del virus con la célula (Chambers 1990). El gen E es una de las regiones genómicas del virus más conservadas y por esta característica se recomienda para realizar estudios filogenéticos y evolutivos (Holmes 2006).

El VDEN existe en la naturaleza como cuatro serotipos conocidos como VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4, los cuales difieren en 22 a 32% de la secuencia del genoma y de aminoácidos de sus proteínas (Weaver & Vasilakis, 2009). Al comparar la secuencia nucleotídica de ciertas regiones del RNA viral obtenida de cepas del mismo serotipo, se encuentra que algunas difieren en más del 6% y esto ha permitido agrupar la población viral en genotipos así: DENV-1 en cinco (I – V), DENV-2 en seis (Americano, Asiático/Americano, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2 y selvático), DENV-3 en cuatro (I – IV) y DENV-4 en tres (I– II y selvático).

En Latinoamérica desde 1981 se reportó la presencia de los cuatro serotipos y con base en estudios filogenéticos con cepas de los años 90 se ha podido detectar uno o dos genotipos de cada uno. VDEN-1 del genotipo IV y V; VDEN-2 del III y IV; VDEN-3 del III; y VDEN-4 del II (Cheng & Vasilakis 2011). Cada serotipo se ha aislado de pacientes con dengue severo, aunque el VDEN-2 es el más frecuente y el más relacionado con enfermedad fatal (San Martín et al. 2010). Con respecto a la virulencia de los otros, se ha visto que la cepa del VDEN-3 del Brasil y Cuba tiende a causar mayor severidad de la enfermedad comparada con la de Nicaragua, Venezuela y Colombia (Gómez et al. 2008); y sobre el VDEN-1 y VDEN-4 y los datos disponibles hasta la fecha no son suficientes para concluir sobre el potencial patógeno.

Actualmente co-circulan los cuatro serotipos en los países de América que reportan casos dando origen al llamado patrón hiperendémico. Este patrón se caracteriza por fluctuaciones temporales en la incidencia de casos y dengue severo usualmente acompañadas por oscilaciones de la abundancia (predominancia) de cada serotipo con respecto a los otros. Este fenómeno está bien documentado en Puerto Rico (Bennett 2010), México, Nicaragua y Brasil (San Martín et al. 2010). Los cambios de predominio del serotipo usualmente se deben a la introducción de un nuevo genotipo del serotipo o a la resurgencia de una variante genética (linaje) de la cepa que ha venido circulando (Wittke 2002, Thu 2005, Carrington 2005; Fried et al. 2010). Esta diversificación genética le confiere al virus habilidad para mantenerse y predominar causando epidemias explosivas en comunidades donde el umbral de inmunidad al dengue en la población es alto (Holmes 2009).

El monitoreo permanente del virus en una localidad ha sido un componente del control integrado del dengue desde hace al menos tres décadas y se conoce como la vigilancia virológica (Gubler 1989). En regiones de baja endemia con presencia de uno o dos serotipos es gran utilidad para aminorar los efectos de una epidemia, en consideración a que la introducción del serotipo nuevo ocurre semanas antes. Así, se puede predecir anticipadamente el incremento de casos y la frecuencia de severos que podría esperarse (Rigau-Pérez & Gubler,1997). La identificación meramente del serotipo en las cepas aisladas no tiene utilidad en áreas donde co-circulan los cuatro. En este escenario se

deberá monitorear las oscilaciones en la predominancia de cada serotipo, la introducción de nuevos genotipos y la diversificación genética de la cepa del genotipo prevalente.

En Colombia, la presencia de los cuatro serotipos del VDEN se reportó en los años 80 (Boshell et al 1986) y actualmente co-circulan los genotipos de cada serotipo presentes en América que se mencionaron anteriormente (Méndez, 2011; Gómez et al. 2009; Ocazonez et al. 2006). La vigilancia virológica ha estado a cargo del Instituto Nacional de Salud (INS), con excepción de Antioquia que la realiza el Laboratorio Departamental de Salud Pública (LDSP) desde 1992 (Díaz et al. 2007). A nivel nacional, se hace con muestras de sueros que ocasionalmente remiten los LDSP de cada Departamento al INS y de esta manera es poco probable detectar oportunamente recambio del serotipo predominante.

La vigilancia virológica continua que permitió detectar oscilaciones de serotipo asociadas a cambios en la incidencia del dengue en Colombia, se hizo en el Departamento de Santander durante un período de 10 años entre 1998 – 2008. Esta actividad fue posible gracias a la cooperación entre el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP-UIS) y la Secretaría de Salud del Departamento y está bien documentada. Se encontró que el VDEN-1 se hizo predominante en 1998 y años después en 2007-2008, ambos periodos coincidiendo con epidemia aunque el segundo con notado incremento de casos severos; el VDEN-2 predominó en 2000 -2001 y ha sido el serotipo más asociado a casos severos; el VDEN-3 se re-introdujo en 2001 y dominó hasta 2006 coincidiendo con alta incidencia de casos pero baja frecuencia de casos severos; y el DENV-4 fue el menos prevalente con aislamientos ocasionales en 2001-2002 y 2004 (Gómez et al. 2009; Ocazonez et al. 2007; Ocazonez et al. 2006).

La identificación de serotipos del VDEN en otras regiones de Colombia ha sido de interés de grupos de investigación de la Universidad del Valle y la Universidad del Norte. En los estudios realizados se reporta la co-circulación de 3 o 4 serotipos en Cali y Barranquilla y municipios del área metropolitana de estas capitales (Falconar & Romero-Vivas 2011; Falconar et al 2006). Lo mismo se encontró con la vigilancia que realiza el LDSP de Antioquia (Díaz et al., 2007).

Como se mencionó, otro componente de la vigilancia virológica en áreas donde co-circulan los cuatro serotipos es el monitoreo permanente de la introducción de nuevos genotipos, el reemplazo de linajes de cada serotipo y la resurgencia de cepas virales con mayor potencial patógeno. Está documentado el flujo de cepas de VDEN-3 entre países de Centro y Suramérica (Araujo et al 2009; Villabona et al. 2009, Aquino et al, 2008); un estudio filodinámico ha mostrado que la cepa del VDEN-4 introducida al Brasil en 2004 provino de la China (Lucas de Melo et al., 2009); se ha demostrado el tráfico de linajes distintos del VDEN-2 entre regiones distantes de Puerto Rico (Ref.); y el incremento del dengue severo se ha relacionado con resurgencia de una nueva linaje del genotipo III del VDEN-3 (Dash et al 2006; Messer et al. 2002).

El tráfico y dispersión de cepas del VDEN y demás eventos relacionados con la genética del virus se realiza mediante estudios filogeográficos, esto debido a que el genoma viral experimenta cada año 5 a 11 substituciones de nucleótidos originándose nuevas linajes (Bennett et al. 2003; Wittke et al. 2002). Más aún, esas substituciones conducen a extinción y dispersión de los linajes y esto coincide con brotes y períodos de silencio epidemiológico. Con este análisis es posible inferir el tamaño de la población viral que

circula y estimar y reconstruir la historia de incidencia de la infección (Grenfell et al. 2004; Holmes et al 1995); además, trazar en tiempo y espacio la ruta de dispersión del virus cuando se comparan un número significativo de cepas. Con estos estudios se demostró que los picos epidémicos suelen estar precedidos 5 a 8 meses por una expansión de la diversidad de la población viral, mostrando el valor pronóstico de la vigilancia basada en el análisis filodinámico (Bennett et al 2009). Una utilidad de este tipo de estudio, es el detallado conocimiento que se tiene de la dispersión de DENV-3 genotipo III en las Américas luego de su introducción en 1994 (Araújo et al. 2009, Villabona et al. 2009, Ospina et al. 2010).

De los estudios filogenéticos se concluye que los VDENV se introdujeron al Continente Americano desde sitios geográficos diversos en Asia, África y las islas del Pacífico, haciendo su arribo a través de las islas del Caribe y/o Centroamérica y de aquí se diseminaron países Suramericanos (Rico-Hesse 2003; Holmes 2006; Carrington et al. 2005,). Está bien fundamentado que estas introducciones estuvieron asociadas a epidemias (San Martín et al.2010; Gubler 2006).

La hiperendemicidad actual del VDENV en América ha estado y continúa siendo favorecida por una mayor dispersión y tráfico de cepas virales. Esto porque las personas ahora pueden viajar de un país a otro del Continente, Asia o de África y transitar entre municipios de las fronteras con mayor facilidad y frecuencia. Este patrón epidemiológico incrementa el riesgo de epidemias y de enfermedad severa en el individuo infectado. 1) la abundancia de cepas favorece la generación de linajes con mayor potencial virulento, esto es: cepas más hábiles para transmitirse y dispersarse en la comunidad en consideración a que se ha demostrado que algunas infectan más productivamente mosquito *Aedes* criado en el laboratorio que otras (Cologna et al. 2005; Chaudhry et al 2006; Armstrong & Rico-Hesse 2003). 2) la variación genética de la población viral puede originar cepas más patógenas para el humano en términos de producir viremias a título mayor y modular la respuesta inmune hacia un patrón inflamatorio (Sanchez-Vargas & Ruiz 1996; Cologna et al 2003; Prior et al 2001). 3) los pobladores están a mayor riesgo de sufrir infecciones secuenciales por serotipos distintos y está suficientemente demostrado que esto favorece el desarrollo de dengue severo con manifestaciones hemorrágicas (Halstead 2009)

La diversidad genética del VDENV de Colombia ha sido poca estudiada, los escasos estudios se han realizado con cepas de un único serotipo y de una misma región. Esto hace que las conclusiones sean imprecisas y la vigilancia basada en la filodinámica de limitada utilidad en términos de herramienta para la prevención y control del dengue. No obstante, se resaltan algunos hallazgos: i) cepas del VDENV-1 de 1978 - 2008 fueron genotipo V (Díaz et al 2007, Méndez et al 2010, CINTROP-UIS datos no publicados); VDENV-2, de 1982 a 1987 fueron genotipo Americano y de 1990 a 1997 Asiático/Americano (Méndez et al 2003); VDENV-3 de 2001 – 2007 fueron genotipo III (Villabona et al 2009, Ospina et al 2010); VDENV-4 de Santander 1998-2004 y de Antioquia 1994-2007 fueron genotipo II (Cortés et al. 2007, Díaz et al. 2007).

Sobre la dinámica poblacional del DENV de Colombia la información es aún más precaria. Los estudios filogenéticos sugieren un flujo frecuente de cepas de VDENV-2 y VDENV-3 desde y hacia Venezuela, y más ocasionalmente desde Ecuador (Villabona et al 2009, Ospina et al 2010), mostrando que las fronteras con dichos países son rutas de entrada de virus al país. Otros estudios indican que podría haber intercambio de cepas virales con las islas del Caribe y Centroamérica (Foster et al 2004, Bennet et al 2006, Ospina et al

2010) pero en este caso la ruta de tráfico no se ha podido identificar. Las rutas de dispersión dentro del país y la influencia de la evolución de cada serotipo en la ocurrencia del dengue en el país son igualmente desconocidas. De conocerse esta información se podría correlacionar con la actividad del dengue y usarse para alimentar modelos matemáticos de modelamiento para predecir el comportamiento de la enfermedad en corto, mediano y largo plazo. Varios estudios demuestran la utilidad de este modelamiento para el control del dengue (Rodríguez et al. 2011; Lourenço & Recker 2010; Wikramaratna et al. 2010; Recker et al. 2009; Adams et al. 2006; Focks et al. 1995).

Proponemos esta investigación, con el objeto de generar nuevo conocimiento al existente en el tema de la contribución de la cepa del virus a la ocurrencia del dengue y severidad de los casos, y como un todo aplicarlo hacia la instalación a nivel nacional de una sistema de vigilancia virológica como herramienta para predecir el comportamiento epidemiológico de la enfermedad.

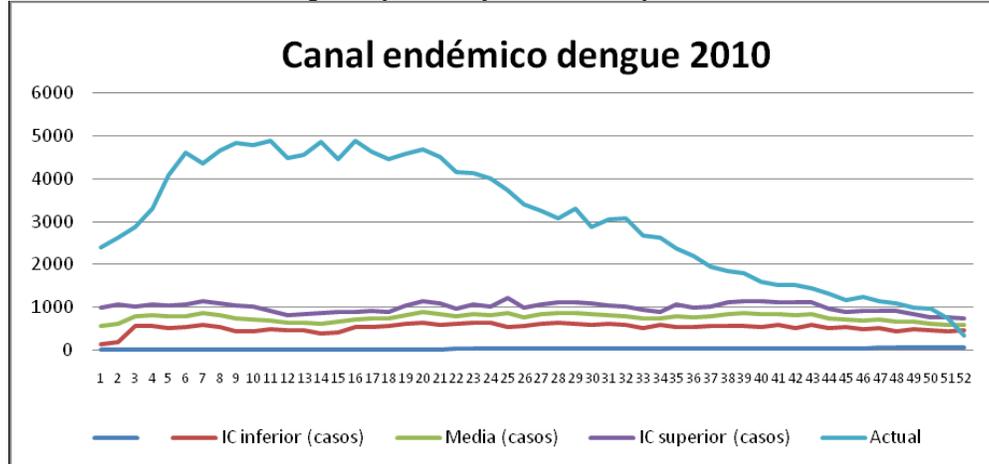
## 5. JUSTIFICACIÓN

Tradicionalmente el control del dengue se ha centrado en las medidas encaminadas a la eliminación del vector. Estas son de diferente naturaleza e incluyen desde el uso de insecticidas y larvicidas hasta las acciones para eliminar los criaderos de mosquitos a través de campañas educativas con diferentes estrategias. Aunque todos estos métodos se siguen usando en Colombia es indudable que su resultado no es el esperado como lo demuestra la Figura 2, donde se observa que la incidencia del dengue durante la primera mitad de 2010 superó en más de cinco veces la media esperada para esta época.

Una de las razones por las que estas medidas de control no están siendo efectivas es que ellas no son sostenibles a largo plazo. Además de sus efectos adversos en el ambiente, el uso continuado de insecticidas selecciona cepas de mosquitos resistentes a esas sustancias. Las medidas educativas también tienen problemas de sostenibilidad puesto que las campañas, cuando se repiten por largo tiempo, van produciendo cansancio y la población blanco se va haciendo insensible al mensaje.

Una opción para optimizar la eficacia de las medidas anteriores sería reservarlas para los momentos en los cuales se prevé o apenas se inicia una situación epidémica como la del año anterior. Para lograr anticipar estas situaciones es indispensable contar con un sistema con capacidad predictiva. Algunas observaciones recientes hacen pensar que existe cierta sincronía entre el fenómeno climático "del niño" y las epidemias de dengue, presentándose estas últimas con un año de desfase con respecto al fenómeno climático (Guillermo Rúa, Universidad de Antioquia, comunicación personal). Así, la epidemias de 1998 y 2010 pudieron haberse previsto por el niño observado durante 1997 y 2009, respectivamente. Sin embargo un estudio reciente concluye que la asociación entre el niño y el dengue aún es débil y se requieren más datos para tener conclusiones definitivas (Johansson 2009).

Figura 2. Número de casos de dengue esperados y observados por semana durante 2010 en Colombia.



Fuente. SIVIGILA- Instituto Nacional de Salud

El otro recurso con capacidad predictiva para dengue es un sistema de vigilancia virológica acoplado a un sistema integral de vigilancia epidemiológica que incluya además componentes de vigilancia entomológica, clínica y serológica (Gubler 1989). La vigilancia entomológica ha demostrado tener poco valor predictivo pues ocurren epidemias en lugares con índices bajos de infestación (Goh 1997, WHO 1997). La vigilancia clínica y serológica son importantes pero no permiten anticipar las epidemias. El énfasis debe pues darse a un sistema de observación sostenida de la circulación viral que detecte oportunamente la introducción o a la rápida expansión de serotipos, genotipos o linajes de dengue. Varias observaciones realizadas en las décadas anteriores muestran la asociación entre estos cambios y las epidemias de dengue y sugieren que estas epidemias se podrían predecir con un sistema sensible de vigilancia de los virus (Rigau-Pérez & Gubler 1997, Wittke 2002, Carrington 2005, Thu 2005).

En el futuro previsible, las vacunas son la mayor esperanza para la prevención del dengue. Se han desarrollado varias vacunas con diferente composición contra los cuatro serotipos de dengue (Colleret al. 2011, Rothman 2011). Al menos cuatro de ellas se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico, incluyendo dos de ellas en Colombia (Villar LA y Osorio JE, comunicaciones personales). Las dificultades impuestas por los múltiples serotipos y el riesgo de reacciones adversas mediadas por el fenómeno de la ADE han ocasionado que estas vacunas hayan experimentado un largo período de desarrollo, que ha pasado por diferentes estrategias y con resultados que sólo recientemente son prometedores. Es previsible que estas vacunas se encuentren disponibles en algún momento de la presente década pero en cantidades limitadas y a un costo alto.

La particularidades anteriores de la vacuna para el dengue plantean varios interrogantes: ¿A cuál edad se debería iniciar la vacunación?, ¿Cuáles poblaciones deberían vacunarse prioritariamente?, ¿Cómo se va a vigilar la eficacia de la vacuna a largo plazo?, ¿Tendrán estas vacunas un efecto sobre la circulación del virus en la población?, ¿Serán igualmente efectivas contra todos los serotipos?. La respuesta a las primeras de estas preguntas requieren el conocimiento de la inmunidad poblacional por medio de estudios de seroprevalencia, como el que se prevé en este proyecto. Este tipo de estudio requiere de técnicas serológicas especializadas como la neutralización, para la cual algunos de los integrantes del programa AEDES cuentan con experiencia (Gómez

&Ocazonez 2008). Para la respuesta a las últimas preguntas planteadas se requiere fortalecer la capacidad diagnóstica de los laboratorios colombianos con la implementación de las técnicas de aislamiento viral para dengue, como también se prevé en el componente de vigilancia virológica de este estudio, y para la cual también se tiene experiencia por parte de varios miembros de la red que ejecutaría este proyecto (Ocazonez et al. 2006, Ospina et al. 2010, Falconar et al. 2006; Falconar & Romero-Vivas 2011).

En resumen, la ejecución de este proyecto, y otros proyectos conexos que hacen parte del programa AEDES, permitirán: 1. Obtener un panorama más preciso y completa de la dinámica de circulación del virus del dengue en Colombia, 2. Implementar un sistema de vigilancia virológica con potencial poder predictivo sobre la ocurrencia de epidemias de dengue, 3. Conocer el estado inmunitario para el dengue de poblaciones seleccionadas del país y su relación con la circulación viral y la ocurrencia de desenlaces clínicos severos, 4. Seleccionar los grupos poblacionales que serían blanco prioritario de los programas de vacunación y 5. Mejorar la capacidad diagnóstica de los laboratorios del país para la vigilancia integral del comportamiento del dengue y la eficacia de la vacunación.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General

Implementar y evaluar una estrategia de vigilancia de la circulación del virus del dengue y de la inmunidad poblacional al dengue que genere información útil para planificar actividades de prevención y control en el corto, mediano y largo plazo.

### Objetivos Específicos:

1. Poner en marcha un sistema integrado para monitorear la dinámica de circulación de los serotipos del VDENV y determinar la utilidad de la información colectada para predecir el comportamiento del dengue en el tiempo
2. Estudiar la evolución y biogeografía de la población de cada serotipo del VDENV para inferir el origen de las cepas y sus rutas de introducción y dispersión, e identificar localidades de hiperendemicidad con introducción de nuevos subtipos genéticos y recambio en el tiempo de linajes
3. Identificar posibles marcadores genéticos de virulencia de la cepa viral

## 7. MARCOS DE REFERENCIA

### El virus de dengue y su diversidad.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más extendida en la actualidad. La enfermedad puede cursar con un amplio espectro de severidad que va desde la infección asintomática, pasando por la fiebre dengue (FD, llamada también dengue clásico) hasta las formas severas y potencialmente fatales como la fiebre

hemorrágica del dengue (FHD, o dengue hemorrágico) y el síndrome del choque del dengue (SCD).

Esta enfermedad es producida por el virus del dengue (DENV), el cual hace parte del género *Flavivirus* y de la familia *Flaviviridae*. El DENV posee una cápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipídica con dos glicoproteínas: E que es la más abundante y constituye el principal antígeno viral y M más pequeña y unida no covalentemente a E. Ambas participan en el proceso de entrada del virus a la célula. Múltiples unidades de la proteína C conforman la cápside. Las proteínas no estructurales (NS) participan en la morfogénesis del virión pero no se incorporan a él, por lo que se detectan solo en la célula infectada. El genoma es una cadena simple de ARN de aproximadamente 11Kb con un único marco de lectura abierto y regiones 5' y 3' no-codificantes (NC). El genoma se traduce directamente en un polipéptido que origina 10 proteínas en el siguiente orden: NH<sub>2</sub>-5'NC-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'NC-COOH. (Revisado en: Chambers 1990).

El DENV comprende cuatro serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Estos difieren entre 27 y 32% en su secuencia de nucleótidos y entre 22 y 32% en la secuencia de aminoácidos de sus proteínas. Los estudios filogenéticos al interior de estos serotipos muestran que cada uno de ellos se puede descomponer en 3 a 6 linajes mayores llamados genotipos o subtipos que difieren en más del 6% en sus secuencias de nucleótidos: DENV-1 en cinco (I – V); DENV-2 en seis (Americano, Asiático/Americano, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2 y selvático); DENV-3 en cuatro (I – IV); y DENV-4 en tres (I– II y selvático). En Latinoamérica actualmente circulan los genotipos V, Asiático/Americano, III y II, pertenecientes a DENV-1, -2, -3 y -4, respectivamente (Revisado en: Weaver&Vasilakis, 2009).

Varios estudios han explorado la variación genética del DENV-2 con la severidad de la infección (Pandey et al. 2000; Leitmeyer et al 1999; Thant et al. 1996). Estos han mostrado diferencias en el genotipo y varios sitios polimórficos se han postulado como marcadores de virulencia, particularmente variaciones en el gen E y en los extremos 3' y 5' NC (Leitmeyer et al 1999). Algunas de estos polimorfismos han demostrado influir en la capacidad del DENV-2 para replicarse en células humanas (Cologna& Rico-Hesse 2003, Cologna et al. 2005). Igualmente, Roche y colaboradores (2006) encontraron sustituciones en la secuencia del gen NS1 y NS5 e inserciones en la región 3' NC de DENV-3, las cuales fueron relacionadas con menor habilidad del virus para replicarse in vitro. Sin embargo otros estudios han fallado en demostrar esta asociación (Zhou et al. 2006).

### **Origen y dispersión de los serotipos y genotipos virales.**

Los estudios filogenéticos llevados a cabo en una escala más amplia también muestran que la divergencia de las cepas selváticas aisladas de monos ocurrió antes de que se diferenciaron los otros genotipos, sugiriendo que los serotipos de DENV se originaron en los monos y que posteriormente cada uno de ellos dio el salto de especie hacia los humanos. Estos estudios también permiten inferir el origen geográfico, las rutas de dispersión, agrupación y recambio de linajes. Además son una herramienta útil para identificar marcadores asociados a virulencia, cuando las cepas de pacientes con enfermedad severa y leve aparecen agrupadas en ramas distintas del árbol filogenético (Revisado en: Caetano-Allónes 2010; Holmes 2006).

Del continente americano de los años 50 sólo se tiene evidencia de circulación del DENV-2 (genotipo Americano). Entre 1963 y 1977 circuló el DENV-3 (genotipo IV) documentándose su presencia en Puerto Rico y Colombia. En 1977 se introdujo el DENV-1 (genotipo V) el cual se dispersó rápidamente por El Caribe. En 1981 se introducen el DENV-4 (genotipo II) y el genotipo Asiático/Americano del DENV-2. El último de ellos se dispersó y divergió más lentamente que los otros, probablemente por la presencia de inmunidad previa a DENV-2 en la población (Carrington et al. 2005). En 1994 se reintrodujo el DENV-3 genotipo III inicialmente en Centroamérica y de allí se dispersó a México, las islas del Caribe y hacia el 2000 a Suramérica, de donde estuvo ausente por cerca de 23 años (Messer et al 2003; Araujo et al. 2008).

De los estudios filogenéticos se concluye que estos virus circulantes en Las Américas se importaron de sitios tan diversos como Asia, África y las islas del Pacífico. Varios hicieron su arribo a través de las islas del Caribe y posteriormente a Centro y Suramérica (Rico-Hesse 2003; Holmes 2006; Carrington et al. 2005,). Está bien fundamentado que estas introducciones estuvieron asociadas a epidemias (San Martín et al.2010; Gubler 2006). Actualmente en las Américas co-circulan los cuatro serotipos, con diferencias regionales en su distribución y frecuentes cambios en la abundancia relativa de cada uno. En Puerto Rico las oscilaciones de predominio de serotipo han influido notoriamente en la incidencia del dengue y la proporción de casos severos (Bennett 2010). Lo mismo ha sido reportado en México, Nicaragua y Brasil (San Martín et al. 2010). Igual ocurre en Asia; por ejemplo en Bangkok la ocurrencia de grandes brotes cada tres años ha coincidido con un cambio en el serotipo predominante: DENV-2 entre 1973 y 1986, DENV-1 en 1990-1992, DENV-4 en 1993-1994 y DENV-3 en 1995-1999 (Nisalak et al. 2003). En un estudio realizado en Tailandia se demostró que los virus residen, se diversifican y se diseminan desde centros de alta endemia (Cummings et al. 2005).

Varios estudios filogenéticos demuestran la co-circulación y recambios del genotipo en países de América y Asia, coincidiendo con oscilaciones en el predominio de serotipo (McElroy et al. 2011; Carrillo-Valenzo 2010; Aquino et al. 2008; Kukreti et al. 2008; Dash et al. 2006; Rico-Hesse et al. 1998). Este recambio de linajes y genotipos se puede originar en eventos estocásticos ocurridos durante períodos de embotellamiento poblacional (Wittke et al. 2002, MyatThu 2005) o en algunos casos por la selección de mutantes con alguna ventaja adaptativa (Bennett et al. 2006; Holmes 2006; Twiddy et al. 2002).

### **El conocimiento de la circulación de los DENV de Colombia.**

La presencia de los cuatro serotipos en el país se reportó por primera vez a principios de los años 80 (Boshell et al 1986). En los años subsiguientes se ha continuado con este tipo de trabajo y se ha constatado la persistencia de estos, con excepción del DENV-3 en el período 1979 – 2000 (Méndez, 2011; Gómez et al. 2008;). La vigilancia de los serotipos ha sido liderada por el Instituto Nacional de Salud (INS). En Antioquia se ha realizado vigilancia de los serotipos desde 1992 en el Laboratorio Departamental de Salud Pública (Díaz et al. 2007). En Santander se realizó entre 1998 y 2008 en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP-UIS), en cooperación con la Secretaría de Salud Departamental (Ocazonez et al.2006). En el Atlántico y en el Valle del Cauca se ha realizado aislamiento e identificación viral en diferentes períodos como parte de proyectos de investigación

específicos (Falconar et al 2006, Falconar& Romero-Vivas 2011, Villabona et al 2009). En la actualidad la vigilancia de los serotipos sólo se lleva a cabo en el INS y en el Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia

Estos trabajos han demostrado la circulación simultánea de varios serotipos en Medellín, Bucaramanga, Barranquilla y Cali. Algunos estudios han evaluado la influencia de oscilaciones del predominio de serotipo en la epidemiología del dengue en regiones de Colombia pero ninguno a nivel nacional. En Santander en el período 1998 – 2008 el DENV-1 fue prevalente en 1998 y nuevamente en 2007-2008 coincidiendo con alta incidencia de casos ambos períodos; lo mismo se vio con el DENV-2 en 2000-2002; con DENV-3 en 2003-2006; y el DENV-4 fue el menos prevalente con aislamientos solamente en 2001-2002 (Gómez et al. 2009; Ocazionez et al. 2006). Más recientemente, el alarmante incremento de casos en todo el país en 2010 se ha relacionado con predominio del DENV-2, el cual se ha identificado en el 81% de los virus aislados en el INS en ese período (Méndez 2011).

El conocimiento de la diversidad genética al interior de los serotipos en Colombia es limitado debido a que los escasos estudios incluyen cepas de una única región o analizan fragmentos pequeños del genoma (Ospina et al. 2010; Villabona et al. 2009; Méndez et al. 2003). Sin embargo es posible resaltar algunos hallazgos: los DENV-1 de varios departamentos aislados durante 1978 - 2008 resultaron ser del genotipo V (Díaz et al 2007, Méndez et al 2010, CINTROP-UIS datos no publicados). Los DENV-2 de varios departamentos de 1982 a 1987 fueron genotipo Americano y de 1990 a 1997 del Asiático/Americano (Méndez et al 2003); el segundo genotipo también se encontró en aislados de 2000 a 2007 de Antioquia y Santander (Díaz et al, datos no publicados). Los DENV-3 de 2001 – 2007 fueron genotipo III (Villabona et al 2009, Ospina et al 2010). Los DENV-4 de Santander 1998-2004 y de Antioquia 1994-2007 fueron del genotipo II (Cortés et al. 2007, Díaz et al. 2007).

Sobre la dinámica poblacional del DENV de Colombia la información es aún más precaria. Los estudios filogenéticos sugieren un flujo frecuente de cepas de DENV-2 y DENV-3 desde y hacia Venezuela, y más ocasionalmente desde Ecuador (Villabona et al 2009, Ospina et al 2010) sugiriendo que las fronteras con dichos países son rutas de entrada de virus al país. Otros estudios indican que podría haber intercambio de cepas virales con las islas del Caribe y Centroamérica (Foster et al 2004, Bennet et al 2006, Ospina et al 2010) pero en este caso la ruta de tráfico no se ha podido identificar. Las rutas de dispersión dentro del país y la influencia de la evolución de cada serotipo en la ocurrencia del dengue en el país son igualmente desconocidas.

### **Importancia de la vigilancia virológica y de los estudios de la dinámica poblacional del DENV.**

Hasta mediados del siglo XX el comportamiento epidemiológico del dengue se caracterizaba por la ocurrencia de epidemias causadas por un solo serotipo el cual prevalecía por tiempo variable hasta inmunizar a una alta proporción de la población o hasta que las condiciones climáticas se hacían desfavorables para la persistencia del vector. En las últimas décadas, con el aumento de los viajes intercontinentales, el crecimiento desmedido y desordenado de las poblaciones urbanas, y otras alteraciones ambientales, se ha hecho frecuente la circulación simultánea de múltiples serotipos en una misma ciudad durante períodos prolongados, dando origen al llamado patrón

hiperendémico, el cual se asocia a infecciones más frecuentes y, potencialmente más severas (Gubler 2004).

Aunque los cuatro serotipos de DENV se han visto asociados a cuadros severos, no lo hacen con igual frecuencia. Las infecciones secundarias por DENV-2 son las más frecuentemente asociadas a las formas graves, en particular a la llamada fiebre hemorrágica del dengue (FHD) y al síndrome del choque del dengue (SCD). Pero no todas las cepas de DENV-2 se comportan igual: la aparición de la FHD y el SCH en las Américas en el Caribe a partir de 1981 y en Suramérica a partir de 1989 han coincidido con la llegada de un nuevo linaje de DENV-2 procedente del sureste asiático, perteneciente al llamado genotipo (o subtipo) asiático-americano (Rico-Hesse et al 1997), el cual ha desplazado gradualmente al subtipo "nativo" americano presente hasta entonces. Este último sólo se asociaba a enfermedad leve (Watts et al 1999). Un fenómeno similar se observó en Sri Lanka en los años 80, en donde el desplazamiento de la cepa prevalente DENV-3 por un nuevo linaje del mismo serotipo coincidió con una epidemia de FHD/SCD, enfermedad rara hasta entonces en ese país (Messer et al. 2002).

De las observaciones anteriores se deriva que la introducción de una nueva cepa de DENV en una región particular, puede seguirse de una epidemia cuya extensión y severidad va a estar dada, en gran medida, por el nivel de inmunidad poblacional (carga inmune) para el serotipo infectante y para los otros serotipos, pero también de la virulencia intrínseca de la cepa (Rodríguez 2010, Gubler1990).

Desde hace más de dos décadas se postuló que el monitoreo de los serotipos circulantes del DENV (vigilancia virológica) era uno de los pilares básicos de la vigilancia epidemiológica y del control del dengue pues, en teoría, permitiría predecir la aparición de epidemias al detectar la introducción y dispersión de serotipos para los cuales no existe inmunidad poblacional (Gubler 198x). Dicha propuesta estaba fundamentada en la observación de que las epidemias eran precedidas por la introducción, varios meses antes, de un serotipo que no se encontraba presente. Esta información podría utilizarse para prevenir las epidemias, siempre y cuando la vigilancia fuera continuada especialmente en los períodos interepidémicos, en que la información fluya oportunamente y se acompañe de medidas ambientales tendientes a disminuir la presencia del vector. Si además, esta se acompaña de una adecuada vigilancia clínico-epidemiológica, se podría alertar a la comunidad médica sobre el aumento del número o la severidad de los casos de dengue, lo cual redundaría en una mejor y más oportuna atención de los pacientes y en una disminución de la incidencia y la letalidad de la enfermedad. Sin embargo estas observaciones y propuestas corresponden a las épocas en que sólo uno o unos pocos serotipos circulaban en una población. La utilidad de la vigilancia de los serotipos en poblaciones en situación de hiperendemia no se ha estudiado con detalle.

### **Nuevos enfoques en el estudio de la dinámica de poblaciones virales.**

Una característica del DENV, y otros virus RNA, es la rápida evolución de su genoma. La tasa de evolución de los cuatro serotipos, consistentemente estimada en diferentes estudios, es de  $5-10 \times 10^{-4}$  sustituciones por sitio por año (SSA). Esto se traduce en un cambio de 5 a 11 nucleótidos por año en todo el genoma, lo que se refleja en la continua aparición de linajes dentro de cada genotipo (Bennett et al. 2003; Wittke et al. 2002). Estas frecuentes substituciones permiten trazar, en el tiempo y en el espacio, la ruta de

dispersión de los linajes virales cuando se tiene una muestra suficientemente densa de cepas estudiadas. Esto constituye la llamada filogeografía, una forma novedosa de integrar el análisis filogenético con la tradicional biogeografía (revisado en Holmes 2004). Un ejemplo de este tipo de estudio es el detallado conocimiento que se tiene de la dispersión de DENV-3 genotipo III en las Américas luego de su introducción en 1994 (Araújo et al. 2009, Villabona et al. 2009, Ospina et al. 2010)

Más importante aún es el hecho de que estos cambios aparecen en la misma escala temporal en la que ocurren los sucesos de la dinámica de las poblaciones virales como introducción, expansión, extinción y dispersión de los linajes, y consecuentemente en los eventos epidemiológicos como los brotes y períodos de silencio epidemiológico. A consecuencia de esto, los cambios en la dinámica de la población dejan una impronta distinguible en la diversidad de los genomas virales de las cepas aisladas. Así, es posible hacer inferencias sobre el tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ). Este enfoque, llamado filodinámico, constituye un método alternativo y novedoso de estimar y reconstruir la historia de la incidencia de la infección (Grenfell et al. 2004; Holmes et al. 1995). Es interesante que en uno de estos estudios mostró que los picos epidémicos de dengue suelen estar precedidos, 5 a 8 meses antes, por una expansión de la diversidad de la población viral, lo cual sugiere que dichas estimaciones podrían tener un valor pronóstico (Bennett et al. 2009).

### **Influencia de la inmunidad de la población en la circulación de los serotipos.**

Estudios experimentales en voluntarios realizados en los años 40 mostraron que la infección por un serotipo cualquiera deja una inmunidad de larga duración contra ese serotipo (inmunidad homóloga) aunque también una inmunidad cruzada (heteróloga) de corta duración para los otros serotipos (Sabin 1950, Gubler 2006). Otros estudios realizados en el sureste asiático mostraron que los cuadros severos de dengue se observan más frecuentemente en personas que tienen evidencia serológica de haber tenido infecciones previas por otro serotipo, sugiriendo que la inmunidad cruzada entre serotipos puede tener un efecto desfavorable a largo plazo (Halstead et al. 1970, Burke et al. 1988, Thu 2000).

La transmisión de los DENV en una comunidad crea cuatro grupos poblacionales con respecto a inmunidad: individuos sin contacto previo con el virus (no-inmunes o susceptibles); con inmunidad protectora para uno o más serotipos (susceptibles a uno, dos o tres serotipos); con inmunidad cruzada (protegidos por corto tiempo contra cualquier serotipo) y con inmunidad a un serotipo que incrementa el riesgo de ADE (Rothman 2011). En consecuencia, la inmunidad poblacional puede determinar, en gran medida, el predominio y la persistencia de los serotipos y puede favorecer o disminuir la capacidad de otros serotipos para infectar y causar enfermedad (Kuno 1997; Fine 1993).

Se ha postulado que la mayor diseminación del DENV-4 comparada con DENV-2-Asiático/Americano luego de las introducciones en América en 1981, pudo deberse a que la población era completamente susceptible al primero y parcialmente inmune al segundo debido a la presencia anterior del genotipo Americano (Carrington et al. 2005). También se ha sugerido que la inmunidad a DENV-1 y -3 originó anticuerpos que favorecieron las infecciones del DENV-4 y neutralizaron las del DENV-2 (Halstead 2008). Los cambios del predominio de serotipo en Tailandia se han explicado por inmunidad protectora cruzada de la población (Wikramaratna et al. 2010; Adams et al. 2006).

Existe suficiente evidencia demostrando que el dengue severo es más frecuente en localidades donde han circulado varios serotipos con ciertos intervalos. En Cuba ocurrió una epidemia en 1977 por el DENV-1 cuando la población era parcialmente inmune al DENV-2-Americano pero ninguna de las infecciones secundarias con la secuencia DENV-1 □ DENV-2 resultaron severas. Lo contrario fue visto en 1981 en los inmunes a DENV-1 que se infectaron durante la introducción del DENV-2 Asiático/Americano, y aún más en 1997 cuando este mismo genotipo se hizo predominante causando una nueva epidemia (Guzmán et al. 2000 y 2002). Un estudio reciente en ese mismo país sugirió que la infección secuencial DENV-1 - DENV-3 estuvo asociada a dengue severo en la epidemia de 2001-2002 por DENV-3 (Álvarez et al.2006).

La influencia del ADE en la dinámica de circulación de serotipos ha sido evaluada usando modelos probabilísticos. El análisis sugiere que el ADE proporciona una ventaja competitiva a aquellos serotipos que son susceptibles a esa potenciación sobre aquellos que no lo son y que esa ventaja es mayor cuanto más serotipos estén circulando en la localidad (Cummins et al. 2005). Se infiere que el ADE, por sí sola, puede inducir la co-existencia de cepas y producir desfases en las oscilaciones de los serotipos (Recker et al. 2009; Ferguson et al. 1999).

El papel de la inmunidad poblacional en la transmisión del dengue en Colombia no ha sido investigado. Un estudio en Santander mostró que las infecciones secundarias fueron más frecuentes en el período cuando el DENV-2 fue predominante y al contrario cuando fue el DENV-3 a pesar de la supuesta endemicidad por los otros serotipos (Ocazonez et al. 2006). Este hallazgo sugirió que anticuerpos contra los otros serotipos en individuos sanos podrían neutralizar cruzadamente al DENV-3 impidiendo que la infección se manifestara clínicamente, pero esto no ha sido probado aún. Por otra parte, el predominio de DENV-1 seguido de DENV-2 se podría postular como explicación del incremento alarmante del dengue severo en 2010. Sin embargo son necesarios estudios para probar esta hipótesis.

## **8. ANÁLISIS SITUACIONAL DE LA TEMÁTICA DEL PROGRAMA**

En 2010 murieron más de 200 personas y se notificaron más de 150.000 casos, de los cuales 9.000 se clasificaron como dengue grave. (Instituto Nacional de Salud 2011). Sin embargo estos datos tienen el sesgo del subregistro habitual causado porque el paciente no consulta y el médico no identifica la enfermedad o no la notifica. En algunas partes del mundo se ha estimado que el número real de casos es 5 a 10 veces mayor al notificado, por lo cual podríamos inferir que hubo al menos 750.000 casos de dengue el año pasado. Si asumimos conservadoramente en 5 días la incapacidad laboral o escolar producida por el dengue y que dos terceras partes de los casos corresponde a personas en edad laboral o escolar, entonces podemos calcular en 2.500.000 los días de trabajo o estudio perdidos por causa del dengue.

La situación del dengue en Colombia y su impacto en la salud y la economía de los colombianos varía año por año. Dado que la incidencia del año pasado estuvo cinco veces por encima del índice endémico de dengue, podríamos asumir que en un año no epidémico el número de días perdidos podría ser de aproximadamente 500.000.

La situación a nivel global no es mejor. Se estima que dos quintas partes de la población mundial viven en áreas infestadas por el vector, esto es aproximadamente 2.500.000 millones de personas. El número de infecciones notificadas anualmente se ha venido incrementando en forma sostenida y actualmente es de aproximadamente un millón de casos notificados anualmente. De estos aproximadamente se hospitalizan 500.000 lo cual indica que hay un gran subregistro de los casos no severos. Se estima que el 2,5% de los pacientes que necesitan hospitalización, fallecen, lo que suma aproximadamente 12.500 muertos por año (WHO 2009).

## 9. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y/O AREA TERRITORIAL BENEFICIADA

Aunque la vigilancia de los serotipos y otros eventos de la dinámica de población viral serán implementados en ocho municipios: Bucaramanga, Cali, Medellín, Pereira, Yopal, Arauca, Villavicencio y Cúcuta. Sin embargo, al funcionar el estudio como un sistema de información y análisis integrado a la Red Nacional de Laboratorios en cabeza del Instituto Nacional de Salud, se podrán observar o aproximar los datos de circulación del DENV en otras regiones, extendiendo el beneficio a toda Colombia.

## 10. METODOLOGÍA

### Diseño del estudio

Descriptivo longitudinal prospectivo. Se realizarán asociaciones entre variables a modo exploratorio.

### Población y muestra

#### 1. Muestras de suero para intentos de aislamiento

*Selección en ciudades de monitoreo* - en cada capital de departamento, un día de cada semana el (a) funcionario (a) vinculado al Programa seleccionará los sueros de los que remiten las EPS al Laboratorio Departamental de Salud Pública. En total se contemplan 7 ciudades: Bucaramanga, Cúcuta, Yopal, Arauca, Villavicencio, Medellín y Cali. Serán seleccionados sueros que hayan sido colectados durante el periodo febril y almacenados a 4°C máximo 5 días. El almacenamiento de las muestras se hará a -70°C siguiendo el procedimiento rutinario, en cada ciudad seleccionada para el estudio.

*Criterios para calcular el número de sueros:* se consideraron dos variables: la sensibilidad de la técnica (20%) y el predominio de cada serotipo - se presumió máximo 1% de aislamientos del silente (de muy baja circulación) tomando como referencia experiencias previas (Ocazionez et al. 2006; Gómez et al. 2009).

*Número de sueros:* Serán procesadas hasta un total de 20,430 sueros que se seleccionaran con una frecuencia de hasta 15 semanales por cada ciudad para monitoreo y distribuidas así:

- Primer año (Fase 1) hasta un total de 4,680 de los cuales 3900 serán procesadas en el CINTROP/UIS de casos de Santander, N. de Santander, Arauca, Meta y Casanare; y los restantes 780 en la UNIVALLE.
- Segundo y tercer año (Fase 2) hasta un total de 10,920 sueros de los cuales 7,800 en el CINTROP, 1560 en la UNIVALLE y 1560 en el LDSP de Medellín
- Cuarto año – 46 semanas (Fase 3) – hasta 4830 sueros de los cuales 34500 en el CINTROP, 690 en la UNIVALLE y 690 en el LDSP de Medellín

## 2 Aislamiento viral e identificación del serotipo

El sistema estará basado en el aislamiento viral en cultivo celular y la identificación de los serotipos del dengue con sueros monoclonales específicos de serotipo tal como ha sido descrito anteriormente (Gubler et al. 1984; Falconar et al. 2006; Ocazonez et al. 2006). Brevemente, los sueros serán inoculados sobre monocapas de células de mosquito (línea C6/36) y serán incubadas durante 7 días. Al término de esta semana los sobrenadantes serán cosechados y las células fijadas en láminas portaobjeto. La detección del crecimiento viral se hará por inmunofluorescencia directa con suero humano de alto título anti-dengue marcado con fluoresceína. Las células de cultivos positivos en este procedimiento serán procesadas por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos de serotipo y conjugado fluorescente anti-ratón para identificar el serotipo infectante. Los sobrenadantes de los cultivos positivos serán repartidos en tres alícuotas de al menos 0,5 ml y congelados a -70 grados en crioviales. Una de estas alícuotas permanecerá almacenada en el laboratorio donde se hizo el aislamiento, otra irá al banco de muestras del programa AEDES en Bucaramanga y la tercera será utilizada para la extracción y posterior amplificación del genoma como se detalla adelante.

## 3. Población viral a estudio

Se tendrán las siguientes fuentes de cepas virales:

- Aisladas en el presente estudio
- Aisladas en otros proyectos de la Programa
- Aisladas en el INS

Dado el desconocimiento en el tamaño de población de VDEN en el país y de la distribución temporal de los serotipos en los sitios geográficos donde se realizará el monitoreo, se tomará una muestra por conveniencia más no arbitraria. Se prevé aislar y serotipificar durante el estudio al menos 100 cepas de cada departamento de la región Nororiental y 60 cepas de cada uno de los otros, para un total de 680 cepas. De estas, se seleccionarán 400 para la determinación del genotipo y de estas 100 para un estudio filogenético más detallado.

La selección de los virus a estudio se hará procurando maximizar la representatividad por sitio y por año, de tal manera que no haya grandes sesgos en el muestreo derivados de los cambios en la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, si se realizan varios aislamientos de un mismo serotipo en la misma ciudad durante una semana, sólo se seleccionará uno de ellos para determinar el genotipo, a menos que haya información que sugiera co-circulación de varios genotipos. Los aislamientos realizados durante los períodos interepidémicos serán genotipificados prioritariamente. Como existe la posibilidad de que se presentes brotes en localidades distintas a las seleccionadas para este estudio y que también podrían servir de puerta de entrada, (por ejemplo Leticia, San

Andrés, Llanos Orientales, Costa Pacífica) se procesarán aproximadamente 100 cepas del virus adicionales que serán suministradas por el Instituto Nacional de Salud (INS) como producto de la vigilancia virológica rutinaria de esa entidad

#### 4. Identificación del genotipo y caracterización molecular de los aislados

Para la identificación de los genotipos y los análisis de la dinámica de las poblaciones virales se realizará análisis filogenético de secuencias parciales del genoma viral tal como está descrito (Díaz et al. 2006). Brevemente, el RNA viral será extraído del sobrenadante del cultivo celular positivo utilizando columnas de sílica disponibles comercialmente. El RNA será retrotranscrito a cDNA utilizando hexámeros aleatorios como "primers". A continuación el gen de la proteína de envoltura (E) será amplificado por PCR y el producto será verificado por electroforesis en gel de agarosa. Finalmente el producto de la amplificación será remitido para secuenciación en un servicio comercial especializado. Los detalles técnicos de la retrotranscripción, amplificación y secuenciación, fueron descritos previamente (Díaz et al. 2006). Para la identificación del genotipo se utilizará la secuencia de aproximadamente 500 nucleótidos del extremo carboxi-terminal del gen de la proteína de envoltura (E) del DENV. De acuerdo a los resultados obtenidos en este análisis, y a los datos epidemiológicos y clínicos, se seleccionarán aproximadamente 25 cepas de cada serotipo para un análisis más detallado utilizando la secuencia completa del gen E. Se seleccionó este gen por ser del cual se dispone de un mayor número de secuencias disponibles en los bancos de datos bioinformáticos y por haber demostrado producir resultados robustos en otros trabajos de esta naturaleza (Villabona et al. 2009; Ospina et al. 2010).

#### 4. Búsqueda de polimorfismos y marcadores genéticos

Para identificar posibles marcadores genéticos virales asociados al potencial epidémico y a la virulencia de la cepa se realizará un análisis de asociación de los polimorfismos genéticos encontrados con la severidad de la enfermedad en la persona de la cual se obtuvo el aislado. Para este efecto se seleccionará una submuestra de aislamientos obtenidos de casos bien caracterizados clínicamente y que presentaron cuadro grave (FHD) o cuadro leve (FD). Estos aislados serán secuenciados en busca de polimorfismos en las secuencias de los genes NS1, NS3 y la región no codificante 3'. Estos genes serán amplificados y secuenciados en forma similar a como se describió antes. Cada polimorfismo no sinónimo será analizado por individualmente en una matriz de 2x2 en la cual los diferentes aminoácidos (o nucleótidos para la región no codificante) observados se cruzará con el desenlace clínico codificado, de acuerdo a las definiciones tradicionales de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1997), ya que estas son más estrictas que las más recientes (WHO 2009). Para controlar el componente inmunopatogénico de la severidad, el cual puede obrar como variable de confusión en este tipo de análisis, los sueros de los cuales se obtuvieron los aislamientos serán incluidos en el proyecto de inmunidad al dengue en pobladores de Piedecuesta y el cual está incluido en la presente Propuesta.

#### 5. Análisis filogenético, biogeográfico y filodinámico.

Las secuencias obtenidas serán ensambladas y luego alineadas con secuencias de referencia representativas de cada uno de los genotipos de ese serotipo y con otras previamente obtenidas de cepas colombianas y de otros países, utilizando el programa

Clustal X. A continuación se llevará a cabo el análisis filogenético utilizando métodos basados en distancia (neighbor-joining) y en caracteres (máxima parsimonia y probabilidad bayesiana). Para estos se utilizarán los programas PAUP 4.10 y MrBayes. La determinación del origen y las rutas de dispersión de los diferentes linajes se hará de dos maneras: por análisis de dispersión-vicarianza (Ronquist 1997) utilizando el programa DIVA 1.2 como en el estudio de Villabona et al (2009). Adicionalmente los episodios migratorios serán inferidos codificando el origen geográfico de cada aislado como estados discretos de un carácter adicional de cada aislado. El estado de los nodos internos del árbol filogenético serán inferidos buscando la reconstrucción más parsimoniosa. Las transiciones o cambios de estado serán mapeados en el árbol filogenético y serán considerados como indicio de episodios migratorios, tal como se ha realizado en otros trabajos (Carrington 2005, Araujo 2008).

Para explorar la asociación entre los eventos de la población viral (introducción, expansión, embotellamientos y extinción) con los eventos epidemiológicos (brotes, silencios epidemiológicos, cambios en la severidad) se utilizará el enfoque filodinámico (Grenfell et al. 2004) estimando el tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ) en función del tiempo, utilizando la función "bayesian skyline plot" implementada en el programa Beast v1.4.8 (Drummond & Rambaut 2007). Las líneas así obtenidas serán superpuestas en las gráficas de incidencia de mensual de dengue. El ajuste entre las fluctuaciones de  $N_e$  inferidas a partir de las secuencias y la incidencia obtenida de los datos epidemiológicos serán analizados por análisis de correlación de Poisson, como se describe en detalle por Bennett et al. (2009).

#### 6. Formulación y evaluación de un modelo predictivo para el dengue.

La formulación del modelo predictivo de la incidencia de dengue será llevado a cabo integrando los datos notificados a las instituciones oficiales a través del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), los datos de los estudio serológicos del punto anterior y los de circulación de serotipos obtenidos en el objetivo 1. Este sistema será formulado, evaluado y reformulado a medida que se vayan obteniendo los resultados. La formulación será llevada a cabo siguiendo lineamientos previamente descritos (Grenfell & Anderson 1985; Ferguson et al. 1999; Rodríguez-Barraquer et al. 2011).

#### 7. Organización y análisis de datos

Se construirán bases de datos en Excel y los datos serán analizados usando pruebas estadísticas paramétricas y no-paramétricas, según corresponde, para establecer la significancia de las diferencias entre secuencias de cepas que causaron dengue de distinta severidad, establecer correlaciones entre variables (frecuencia temporal de aislamientos de cada serotipo, número de casos, severidad de la enfermedad, tipo de infección, y otras). Se cuenta con software de STATA y SSPS version 11, los dos licenciados.

**Aspectos éticos.** Este estudio se califica como de mínimo riesgo por las siguientes razones: 1. Es observacional. No habrá componentes experimentales. 2. En su mayor parte está enfocado en el estudio del virus del dengue, más que en los pacientes que tienen la enfermedad. En el componente de medición de la inmunidad poblacional si se enfocará en la presencia de inmunidad al virus en la población. 3. La única muestra que

se tomará a los pacientes y a la población que se estudiará para medir la inmunidad, es la sangre, donde se espera detectar el virus y los anticuerpos. Este tipo de muestra se utiliza rutinariamente para muchos estudios paraclínicos y será tomada por personal entrenado y encargado de este tipo de procedimientos en los centros de atención a los cuales llega el paciente. Los riesgos asociados a este tipo de muestra son sangrado (hematomas) y más raramente infecciones en el sitio de toma de la muestra. 4. El virus del dengue está clasificado como de nivel de seguridad 2. El manejo de la muestra y de los aislamientos logrados será realizado en laboratorios con dicho nivel de bioseguridad utilizando cabinas de seguridad biológica que protejan al operario y los materiales manipulados (tipo II-A o II-B). 5. Se solicitará consentimiento informado para la toma de muestras y de datos clínicos utilizando para tal efecto el formato previamente diseñado y unificado del programa AEDES.

## Descripción de los Participantes

### a) Actores nacionales

Dimensión territorial	Entidad / grupo de investigación o actor del gobierno	Experiencia previa de la entidad
<b>Años 1 - 4</b>		
Santander	UIS - Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP). Gobernación de Santander, Secretaría de Salud – Laboratorio de Salud Pública (LSP)  Líder: Raquel E Ocazonez	Ejecución del programa de vigilancia en municipios de Santander en el periodo 1998 – 2008 (ver publicaciones)
N. de Santander	Universidad de Pamplona – Instituto de Medicina Tropical (IMT) Gobernación de Santander, Secretaría de Salud – Laboratorio de Salud Pública (LSP)  Líder: Omar Giovanni Pérez	UNIPAMPLONA, IMT: investigación en enfermedades parasitarias transmitidas por mosquitos LDSP: Procesamiento de sueros humanos para confirmación del dengue por serología; remisión de sueros para vigilancia virológica al INS
Arauca	Gobernación de Arauca, Secretaría de Salud – Laboratorio de Salud Pública (LSP) Líder: Director (a) del LSP	Procesamiento de sueros humanos para confirmación del dengue por serología; remisión de sueros para vigilancia virológica al INS

Casanare	Gobernación de Casanare, Secretaría de Salud – LSP Líder: Director (a) del LSP	Procesamiento de sueros humanos para confirmación del dengue por serología; remisión de sueros para vigilancia virológica al INS
Meta	Gobernación de Casanare, Secretaría de Salud – LSP. Líder: Jorge Boschell	Procesamiento de sueros humanos para confirmación del dengue por serología; remisión de sueros para vigilancia virológica al INS
Antioquia	Universidad de Antioquia – Grupo de Inmunovirología Líder: Francisco Javier Díaz  Gobernación de Antioquia, Secretaría de Salud – LDSP*  Líder: Director (a) del LDSP	Análisis filogenéticos y biogeográficos del virus DEN (ver publicaciones)  LDSP: vigilancia virológica en Antioquia desde 1992
Valle del Cauca	Universidad del Valle – Grupo VIREM? Gobernación del Valle, Secretaría de Salud – LSP?  Líder: Beatriz Parra	VIREM: proyectos de investigación en dengue (ver publicaciones)  LDSP: Procesamiento de sueros humanos para confirmación del dengue por serología; remisión de sueros para vigilancia virológica al INS
Nacional	Ministerio de Salud – INS, Laboratorio de Virología. Líder: Jairo Méndez	Apoyo logístico en la regiones, intercambio de cepas virales
* esta institución participará a partir del año 2 hasta el año 4		

#### b) Actores internacionales

Año	Institución	Nombre	Cargo
1 - 4	Control and Prevention Disease Center (CDC). San Juan, Puerto Rico	Jorge Muñoz	Director
4	Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, United States of America	Isabel Rodríguez Barraquer	

#### Función en el proyecto de los actores

Entidad / grupo de investigación o actor del gobierno	Compromiso en el proyecto
UIS - Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP). Líder: Raquel E Ocazonez	Coordinación del proyecto Intentos de aislamiento viral en sueros provenientes de Bucaramanga, Yopal, Cúcuta, Arauca y Villavicencio Amplificación de secuencias genómicas de cepas para tipificación y análisis filogenéticos Análisis de datos
Universidad de Pamplona – Instituto de Medicina Tropical Líder: Omar Giovanni Pérez	Colecta, almacenamiento y remisión de sueros para el CINTROP
Gobernación de Arauca, Secretaría de Salud – Laboratorio de Salud Pública (LSP) Líder: Director (a) del LSP	Colecta, almacenamiento y remisión de sueros para el CINTROP
Gobernación de Casanare, Secretaría de Salud – LSP Líder: Director (a) del LSP	Colecta, almacenamiento y remisión de sueros para el CINTROP
Gobernación de Casanare, Secretaría de Salud – LSP. Líder: Jorge Boschell	Colecta, almacenamiento y remisión de sueros para el CINTROP
Universidad de Antioquia – Grupo de Inmunovirología Líder: Francisco Javier Díaz	Análisis filogenéticos, biogeográficos y filodinámicos
Gobernación de Antioquia, Secretaría de Salud – LSP. Líder: Martha Ospina	Intentos de aislamiento viral y tipificación de virus.
Universidad del Valle – Grupo VIREM Líder: Beatriz Parra	Intentos de aislamiento viral y tipificación de virus.
INS, Laboratorio de Virología Líder: Jairo Méndez	Apoyo logístico e intercambio de cepas
CDC, Puerto Rico. Líder: Jorge Muñoz	Asistencia técnico-científica
EUA, Isabel Rodríguez	Análisis de datos

## 11. PRODUCTOS

1. Implementación de un sistema de vigilancia virológica que produzca información en tiempo real sobre la introducción, dispersión y cambios en el predominio de los serotipos. Se espera que los resultados sean empleados por las autoridades de salud para la toma de medidas de intervención que prevenga o atenúe las epidemias. También se espera que el sistema sea adoptado y financiado por el Ministerio de Protección Social aún después de la terminación del programa.
2. Desarrollo de un modelo predictivo de la incidencia del dengue leve y severo que servirá para la planificación de actividades de prevención y control del dengue en cada capital de los departamentos participantes.
3. Alianza operativa entre la academia y el estado. Los académicos se tendrán que involucrar más en los programas de salud pública lo cual mejorará la pertinencia de sus investigaciones posteriores. Las autoridades de salud contarán con un recurso calificado para apoyarse en la toma de decisiones.
4. Fortalecimiento de la comunidad científica. La ejecución del proyecto conllevará un mejor equipamiento de los laboratorios, entrenamiento de personal en técnicas tradicionales y modernas de la virología. Esto dará mayor capacidad a la comunidad para afrontar emergencias derivadas de la introducción o emergencia de nuevos agentes patógenos o reemergencia de agentes que han sido controlados pero pueden reaparecer cuando se baja la guardia en vacunación u otras medidas de control.
5. Cualificación de varios grupos de investigación categorías C y D de Colciencias para que puedan mejorar la calidad de sus propuestas y ejecuciones investigativas.
6. Banco de cepas virales: es útil para estudios posteriores por los investigadores de la red AEDES y otros
7. Conocimiento detallado de la diversidad y la circulación de DENV y de la dinámica de sus poblaciones. Se puede cuantificar por el incremento en el número de cepas aisladas, serotipificadas y caracterizadas molecularmente y por la oportunidad de flujo de la información a las autoridades de salud. Generará un artículo científico y permitirá el desarrollo de una tesis de maestría.
8. Se clarifica sobre el valor predictivo de la vigilancia virológica, esto es, si la información sobre la dinámica de circulación de los serotipos en áreas con patrón hiperendémico influye en la precisión de las estimaciones de la actividad de dengue a corto y largo plazo mediante modelamiento matemático.
9. Aporte de un indicador de actividad en dengue. La estimación del tamaño efectivo de la población viral ( $N_e$ ) es un indicador alternativo de la incidencia de la enfermedad que no se altera por las condiciones que usualmente deforman los datos epidemiológicos como son el subregistro y el sobrediagnóstico dependiendo de la situación.
10. Aporte a la identificación de marcadores genéticos de virulencia del VDENV. Podría ser útil en el perfeccionamiento de las vacunas o medicamentos antivirales o como marcador pronóstico de la enfermedad.
11. Formulación de un modelo predictivo del comportamiento del dengue. Podría llevar a desarrollos conceptuales novedosos.

## 12. RESULTADOS

- **Fortalecimiento Comunidad Científica:**

Formación	Descripción	Personas	Beneficiario
Posgrado	Maestría	4	Comunidad científica Nacional.

- **Apropiación Social del Conocimiento:**

Publicación	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Artículos de revista	Publicación de los resultados	5	Personal de atención en salud y autoridades de salud
Eventos	Participación activa en congresos, simposios y similares	4	Personal de salud y comunidad científica
Capítulo de libro	En un libro de enfermedades infecciosas o de microbiología	1	Estudiantes de áreas de la salud, y personal de atención en salud

- **Generación de nuevo Conocimiento:**

Resultado	Descripción	Cantidad	Beneficiario
Implementación de un sistema de vigilancia del virus	Conocimiento detallado de la circulación de DENV y de la dinámica de sus poblaciones con capacidad de predecir epidemias	5	Secretarías seccionales de salud y la población por ellos atendida
Estimación de la prevalencia de la inmunidad al DENV	Permitirá identificar la edad óptima para aplicar la vacuna contra dengue	1	Secretaría de salud de Santander
Identificación de marcadores moleculares de severidad	Identificación de nuevos polimorfismos potencialmente implicados en virulencia	1	Comunidad científica
Formulación de un modelo predictivo del comportamiento del dengue en Colombia	Herramienta de trabajo que le permitirá a las autoridades de salud planear y mejorar la oportunidad de las medidas de control	1	Autoridades nacionales, departamentales y locales de salud y comunidad en general

### 13. IMPACTOS

Impacto	Año	Descripción
Impactos ciencia y tecnología a mediano plazo	2015	Conocimiento de los genotipos y linajes de los serotipos virales
Impactos ciencia y tecnología a largo plazo	2017	1. Conocimiento de los factores virales y poblacionales que influyen en el comportamiento epidémico del dengue. 2. Identificación de marcadores de virulencia
Impactos científicos y tecnológicos del proyecto en las entidades participantes	2015	Ampliación de las capacidades investigativas por fortalecimiento de los laboratorios y capacitación del personal
En la población / área territorial en términos epidemiológicos	2017	Disminución de la morbimortalidad y la discapacidad por dengue
En la población / área territorial en términos de calidad y oportunidad en la prestación de servicio	2017	1. Optimización del recurso de la vacuna. 2. Mejoría de la oportunidad en la atención y control de epidemias
En la población / área territorial en términos socioeconómicos	2017	Mejoría en la productividad por disminución en las incapacidades laborales
Científicos y tecnológicos del proyecto entre los actores de la red	2014	Mejoría en los conocimientos, en las potencialidades técnicas y en las capacidades analíticas

### 14. COBERTURA / LUGARES DE EJECUCIÓN

La ejecución del proyecto será en 8 municipios con alta incidencia de casos de Dengue en Colombia: Bucaramanga, Cali, Medellín, Pereira, Yopal, Arauca, Villavicencio y Cúcuta.

## 15. CRONOGRAMA POR FASES

N° Actividad	Actividad	Inicio	Final	Ejecución en
1	Fase de preparación: compra de equipos, insumos, contratación de personal, preparación de células y virus de referencia	01/01	03/01	3 meses
2	Organización del sistema de captación, almacenamiento, remisión y registro de de sueros.	04/01	06/01	3 meses
3	Flujo de información y remisión de sueros al CINTROP desde los Laboratorios de Salud Pública de cada Departamento	04/01	09/04	42 meses
4	Procesamiento de sueros para intentos de aislamiento del virus en células de mosquito <i>Aedes</i>	04/01	09/04	42 meses
5	Análisis molecular para identificar el serotipo del virus	04/01	09/04	42 meses
6	Amplificación de secuencias genómicas	04/01	03/04	33 meses
7	Secuenciamiento comercial	10/01	09/04	36 meses
8	Análisis filogenéticos, evolutivos y biogeográficos	01/02	12/04	36 meses
9	Análisis predictivos mediante modelamiento matemático	07/04	12/04	6 meses
10	Redacción de informes parciales y artículos científicos, presentaciones en congresos	01/03	12/04	24 meses
11	Evaluación del sistema de vigilancia virológica implementado	01/03	12/04	24 meses

## 16. POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES

1. La implementación de un nuevo sistema de vigilancia virológica puede generar resistencia en las autoridades de salud y en las instituciones prestadoras de servicios de salud (Ministerio de Protección Social, Secretarías de Salud Departamental, Laboratorios de Salud Pública). Probabilidad mediana. Puede generar falta de homogeneidad en la entrada de datos al sistema. Puede remediarse recurriendo al banco de cepas del INS o buscando fuentes alternativas de las muestras.
2. El montaje y mantenimiento del sistema de aislamiento viral basado en cultivo celular está sometido a frecuentes dificultades por problemas técnicos (contaminación, toxicidad). Probabilidad mediana. Puede solucionarse congelando las muestras o apoyándose en otros laboratorios de la red.
3. Algunos serotipos pueden no circular durante algunos años lo que no permitiría cumplir con el número esperado de cepas a estudiar. Probabilidad baja. No impactaría la calidad de la información ni de los análisis.
4. Los datos epidemiológicos no son igualmente confiables en los diferentes departamentos y ciudades. Probabilidad mediana. Puede generar sesgos y otras dificultades en los análisis estadísticos. Debe vigilarse la calidad de dichos datos y tenerse en cuenta en los análisis.
5. La población puede presentar resistencia a la toma seriada de muestras para los estudios serológicos. Probabilidad alta. Puede disminuir el poder de las inferencias sobre la susceptibilidad al dengue. Su impacto se puede reducir con una muestra alta para cubrir los rechazos.
6. La confiabilidad de los modelos predictivos estaría limitada se la calidad de los datos con los que se alimente el modelo es baja. Probabilidad baja. Esto puede disminuir el poder predictivo del modelo. Se previene con un control de calidad a la información entrante.

## 17. BIBLIOGRAFÍA

1. Aquino J, Tang W, Ishii R, et al. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res* 2008; 137: 266-270.
2. Araújo JMG, Nogueira RMR, Shatzmayr HG et al. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infection Genetics and Evolution* 2009; 9:716-725.
3. Armstrong PM, Rico-Hesse R: Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:539-544.
4. Bennett S, Holmes E, Chirivella M, et al. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2003;20:1650–1658.
5. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol*. 2006 87(Pt 4):885-93.
6. Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Muñoz-Jordán JL, Pybus OG, Holmes EC, Gubler DJ. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Mol Biol Evol* 2010; 27(4):811-8.
7. Boschell J, Groot H, Gacharna M, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986;6:101-102.
8. Caetano-Allónes G. Evolutionary genomics and systems biology. Eds Caetano-Allónes G. (Wiley Blackwell, New Jersey ), 451 p. 2010.
9. Carrillo-Valenzo E, Danis-Lozano R, Velasco-Hernández JX, et al. Evolution of dengue virus in México is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol* 2010;155: 1401-1412
10. Carrington CV, Foster JE, Pybus OG, Bennett SN, Holmes EC. Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas. *J Virol* 2005; 79(23):14680-7.
11. Chambers J, Hahn C, Galler R, et al. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990;44: 649-688.
12. Chaudhry S, Swaminathan S, Khanna N. Viral genetics as a basis of dengue pathogenesis. *Dengue Bulletin* 2006;30:121-132.
13. Cheng R, Vasilakis N. Dengue – Quo tu et quo vadis?. *Viruses* 2011;3:1562-1608.
14. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*. 2003; 77(7):3929-38.
15. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*. 2005;79(2):853-9.
16. Cortés FM, Gómez SY, Ocazone RE. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2007; 57(3): 5p. (electronicversion).
17. Cummings DA, Irizarry RA, Huang NE, et al. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand. *Nature* 2004;427:344–347.
18. Cummings D, Schwart I, Billings L, et al. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Nat AcadSci USA* 2005;102:15249-15264.
19. Dash P, Parida M, Saxena P. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virol J* 2006;3:55-65.
20. DiazFJ, Ospina M, Higueta E, Osorio J. Molecular characterization of dengue viruses isolated in Medellín, Colombia. Abstracts Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, PA. 2007.
21. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007 Nov 8;7:214.
22. Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE. [A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results](#). *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(5):489-506.
23. Foster JE, Bennett SN, Carrington CV, Vaughan H, McMillan WO. Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981-2000. *Virology* 2004; 324(1):48-59.
24. Foster JE, Bennett SN, Vaughan H, Vorndam V, McMillan WO, Carrington CV. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology* 2003; 306(1):126-34.

25. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: 1-6.
26. Goh KT. Dengue a re-emerging infectious disease in Singapore. *Ann Acad Med* 1997; 26:664-70.
27. Gómez S, Villabona C, Torres FA, et al. Dengue virus serotype-3 (genotype III) from Colombia: perspective of its pathogenic potential. *Dengue Bulletin* 2008;32:126-137.
28. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, Holmes EC. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 2004; 303(5656):327-32.
29. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, et al. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies for routine surveillance of dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:158.
30. Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bulletin PAHO* 1989; 23(4):397-404.
31. Gubler DJ: The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:319-330.
32. Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation symposium* 2006, 277:3-16. Discussion 16–22, 71-13, 251–253.
33. Guzman M, Kouri G, Valdes L, et al. Enhanced severity of secondary dengue 2 infections occurring at an interval of 20 compared with 4 years after dengue 1 infection. *PAHO J Epidemiol* 2002; 81:223–227.
34. Guzman M, Kouri G, Valdes L, et al. Epidemiologic studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000; 152:793–799.
35. Guzmán M, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 2003; 27:1-3.
36. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN: Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970; 42(5):311-328.
37. Holmes E, Nee S, Rambaut A, et al. Revealing the history of infectious disease epidemics using phylogenetic trees. *Philos Trans R Soc Lond B Biol* 1995;349:33-40
38. [Holmes EC](#). The phylogeography of human viruses. [Mol Ecol](#). 2004;13(4):745-56.
39. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. [Novartis Found Symp](#). 2006;277:177-87; discussion 187-92, 251-3
40. Holmes E. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2009; 40: 353 -372.
41. Instituto Nacional de Salud, Grupo ETV-INS. Boletín de vigilancia epidemia del dengue en Colombia. Boletín 48, Enero 2011. Disponible en <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=84140>.
42. Kukreti A, Chaudhary A, Rautela, et al. Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during the 2006 dengue fever outbreak in Delhi. *Int J Infect Dis* 2008;12:542-49.
43. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Ann Rev Microbiol* 2008; 62:71-92.
44. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J VIROLOGY* 1999; 73(6): 4738–4747.
45. Lourenço J, Recker M. Viral and epidemiological determinants of the invasion dynamics of novel dengue genotype. *Plos Neg Trop Dis* 2010;4:e894.
46. Lucas de Melo F, Romano C, Andrade P. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia. *Plos Neg Trop Dis* 2009, 3 (4): e390.
47. McElroy KL, Santiago GA. Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986-2007. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 64-71.
48. Mendez JA. Situación epidemiológica del dengue en Colombia. <http://www.google.es/Dengue+serotipos+Colombia>. Consultado en Septiembre 6 de 2011.
49. Méndez JA, Bernal M del P, de Calvache D, Boshell J. Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus dengue tipo 2. *Nova-Publicación científica* 2003; 1(1):37-43.
50. Messer WB, Virarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, Withana N, Gubler DJ, de Silva AM: Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:765-773.

51. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(7):800-9.
52. Myat Thu H, Lowry K, Jiang L, Hlaing T, Holmes EC, Aaskov J. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology.* 2005;336(2):163-72.
53. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:191–202.
54. Ocazionez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febril illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(7):725-731.
55. Ocazionez et al. Serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica Colombiana. *Revista de Salud Pública (Bogotá)* 2007;9:262-274
56. Ocazionez et al. Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colombia Médica* 2005;36:65-72.
57. Ospina M, Diaz FJ, Osório JE. Prolonged Co-circulation of Two Distinct Dengue Virus Type 3 Lineages in the Hyperendemic Area of Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83:672–678.
58. Pandey B & Igarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol.* 2000; 44(3):179-88.
59. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):427-34.
60. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas, RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Noguiera RM & da Rosa AT. Origins of dengue viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230:244-251.
61. Rico-Hesse R, Harrison L, Nisalak A, et al. Molecular Evolution of dengue type 2 virus in Tailandia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:96-101.
62. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003; 59:315-341.
63. Rico-Hesse R. Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virology* 2009; 4: 581-589.
64. Rigau-Pérez J, Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, eds. Gubler DJ, Kuno G (CABI, New York), pp 405-424. 1997.
65. Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro M, Braga C, et al. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *Plos Neg Trop Dis* 2011;5:e935.
66. Sabin AB. Research on dengue during world war II. *Am J Trop Med* 1952; 1:30-50.
67. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82: 128-135.
68. Sánchez IJ, Ruiz BH. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt 10):2541-5.
69. Thant [KZ](#), [Morita K](#), [Igarashi A](#). Detection of the disease severity-related molecular differences among new Thai dengue-2 isolates in 1993, based on their structural proteins and major non-structural protein NS1 sequences. [Microbiol Immunol.](#) 1996;40(3):205-16.
70. Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, Thant KZ, Thein S, Aaskov J. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):593-7.
71. [Thein S](#), [Aung MM](#), [Shwe TN](#), [Aye M](#), [Zaw A](#), [Aye K](#), [Aye KM](#), [Aaskov J](#). Risk factors in dengue shock syndrome. [Am J Trop Med Hyg.](#) 1997; 56(5):566-72.
72. Twiddy S, Woelk C, Holmes E. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol.* 2002; 83(pt.7):1370-1376.

73. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, et al. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol.* 2001;82:2945-2953.
74. Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquivel DR, Jimenez RE. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health.* 2009; 14(10):1241-50.
75. Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Farrar J, Wills B, Lennon NJ, Birren BW, Buchy P, Henn MR, Simmons CP. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in vietnam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(7):e757.
76. Weaver S, Vasilakis N. *Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease.* *Infect Gen Evol* 2009;9:523–540
77. Wittke V, Robb TE, Thu H, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 2002; 301:148–156.
78. Wikramaratna P, Simmons C, Gupta S, et al. The effect of tertiary and quaternary infections on the epidemiology of dengue. *Plos One* 2010;5:e12347.
79. Zang C, Mammen P, Chinnawirotpisan P, et al. Clade replacements in dengue virus serotype 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 2005;79:1523-130.
80. Zhou Y, Mammen Jr M, Klungthong C, et al. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3' untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. *J Gen Virol* 2006;87: 2595-2603.