



Laboratorio de Arbovirus, Departamento de Virología

Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri

Caracterización biológica y molecular de los aislamientos de virus dengue 1 en Cuba, 2020-2022

Autora: Dra. Gladys Solanch Borrero Estrada.

Tutores: Prof. Mayling Álvarez Vera, DrC

Prof. Luis Morier Díaz, MSc

Asesora: Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado, DrCs

**Tesis para optar por el título de Especialista de Primer Grado en
Microbiología.**

La Habana, 2023

AGRADECIMIENTOS

Todo el trabajo realizado fue posible gracias al apoyo incondicional de mi familia, especialmente de mi esposo y mi madre, quienes estuvieron a mi lado en los momentos difíciles. A mi hijo por aliviar mi estrés con sus besos.

A mi tutora Mayling por su dedicación, paciencia y comprensión.

A Melissa por estar presente en cada etapa de esta tesis.

A mi tutora de formación Silvia por su preocupación constante.

A Denelsi, Naifi y Ana, por su colaboración.

A mi querido amigo Darien por sus consejos.

En fin, agradezco infinitamente a todos los trabajadores del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, que de una u otra forma contribuyeron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Contenido

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 4 |
| II.1. Características generales de los Flavivirus: VDEN | 4 |
| II.2. Estructura viral y genoma | 5 |
| II.3. Proteínas estructurales..... | 6 |
| II.4. Proteínas no estructurales | 7 |
| II.5. Ciclo replicativo | 8 |
| II.6. Serotipos y subtipos genéticos: VDEN | 10 |
| II.7. Patogénesis de la infección por el VDEN | 11 |
| II.8. Consideraciones clínicas..... | 14 |
| II.9. Diagnóstico virológico de la infección por el VDEN | 15 |
| II.9.1. Técnicas de aislamiento viral e identificación viral | 15 |
| II.9.2. Técnicas serológicas | 16 |
| II.9.3. Técnicas moleculares..... | 18 |
| III. OBJETIVOS | 20 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| IV.1. Tipo de investigación, diseño de estudio y contexto | 21 |
| IV.2. Definición de universo..... | 21 |
| IV.3. Consideraciones Éticas | 21 |
| IV.4. Cepas virales | 22 |
| IV.5. Líneas celulares | 22 |
| IV.6. Preparación de los lotes virales de los aislamientos de VDEN-1. | 23 |
| IV.7. Determinación del título viral | 24 |
| IV.8. Determinación de las propiedades biológicas de las cepas aisladas. Procedimientos..... | 25 |
| IV.8.1. Efecto citopatogénico (ECP) en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61 | 25 |
| IV.8.2. Determinación del tamaño de las placas | 25 |
| IV.8.3. Determinación de la neurovirulencia en ratones lactantes..... | 25 |

| | |
|---|----|
| IV.9. Determinación de las propiedades moleculares de las cepas aisladas. Procedimientos..... | 26 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 27 |
| V.1. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS CEPAS VDEN-1 | 28 |
| V.1.1. ECP en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61 | 28 |
| V.1.2. Determinación del tamaño de las placas | 29 |
| V.1.3. Determinación de la neurovirulencia en ratones lactantes | 29 |
| V.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS VDEN-1 | 31 |
| V.2.1. Determinación de las propiedades moleculares de las cepas aisladas en el período 2020-2022..... | 31 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 36 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 37 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo con el objetivo principal de caracterizar biológica y molecularmente los aislamientos de virus dengue 1 (VDEN-1) en Cuba en el periodo 2020-2022, ya que desde 1977 este serotipo no circulaba en el país de forma epidémica. Se utilizaron 5 de los aislamientos de VDEN-1 identificados en dicho período, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus, del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La titulación se realizó mediante el ensayo de titulación en placas en la línea celular BHK-21, permitiendo determinar el tamaño de placa. El efecto citopático se determinó en las líneas celulares C6/36 HT y AP-61, y para evaluar la neurovirulencia se inocularon por vía intracerebral ratones lactantes. Las propiedades moleculares se determinaron mediante la extracción de ARN de los lotes virales de cada cepa y PCR a punto final del protocolo ViGenDA para amplificar el producto de TR-PCR. Se obtuvieron las secuencias de las cepas mediante la metodología Sanger. Para el análisis filogenético se empleó la plataforma NGphylogeny.fr. Los 5 aislamientos manifestaron un comportamiento similar en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61, mostrando la cepa 636/22 el ECP de mayor intensidad. Se observaron dos patrones en relación al tamaño de placas y las cepas más neurovirulentas fueron la 219/20 y la 888/20, con un 100% de mortalidad de los ratones inoculados con dichas cepas. Todas las cepas se agruparon en el genotipo V, en clados diferentes junto a cepas de Cuba de años anteriores. Las diferencias aminoacídicas obtenidas no explican las diferencias en las propiedades biológicas.

Palabras claves: virus dengue 1, tamaño de placa, efecto citopático, neurovirulencia, propiedades moleculares.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las principales enfermedades de transmisión vectorial en los humanos y la enfermedad viral transmitida por mosquitos que más rápidamente se ha extendido por el mundo. El vector principal responsable de su transmisión es el mosquito *Aedes aegypti*(1).

La Organización Mundial de la Salud clasifica el dengue en dos categorías principales: dengue (con o sin signos de alarma) y dengue grave; las cuales son causadas por los 4 serotipos virales, causales de la enfermedad (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y DEN-V 4)(2).

El dengue provoca un amplio espectro patológico, que puede abarcar desde una enfermedad asintomática hasta síntomas graves. Algunas personas evolucionan hacia un dengue grave, que puede entrañar un número indeterminado de complicaciones vinculadas a hemorragias graves, insuficiencia orgánica o extravasación de plasma, lo cual es poco frecuente, aunque conlleva un mayor riesgo de muerte si no se trata debidamente(3).

El término dengue se origina de la frase de la lengua swahili "Ka-dinga pepo", que describe esa enfermedad como provocada por un fantasma; la palabra swahili "dinga", del castellano "dengue", trata de describir las molestias del paciente por las artralgias. El primer informe de dengue aparece en una enciclopedia médica china de la Dinastía Jin (265-420) en la que se asocia el vuelo de insectos con "agua venenosa"; Benjamín Rush describe el dengue como "fiebre rompehuesos" en 1778. Se describe por primera vez, en 1635, en Martinica y Guadalupe, según una relación histórica incluida en el sitio de la Organización Panamericana de la Salud. Las primeras epidemias se produjeron casi simultáneamente en Asia, África y América del Norte, en 1781. La enfermedad fue identificada y nombrada como tal en 1779(4).

Actualmente, la enfermedad es endémica en más de 100 países de las regiones de la OMS de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Las regiones más gravemente afectadas son las Américas,

Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental; de hecho en Asia se concentra aproximadamente el 70% de la carga mundial de la enfermedad. Además de que el número de casos aumenta a medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas, incluida Europa, se producen brotes epidémicos de carácter explosivo. Europa ya se enfrenta a la posibilidad de brotes de dengue; la transmisión local se notificó por vez primera en Francia y Croacia en 2010 y se detectaron casos importados en otros tres países europeos. En 2019 se registró el mayor número de casos de dengue jamás notificado en todo el mundo. Todas las regiones se vieron afectadas y por primera vez se registró transmisión de dengue en el Afganistán. En las Américas se notificaron 3,1 millones de casos, más de 25 000 clasificados como graves. En Asia, se notificó un gran número de casos en Bangladesh (101 000), Filipinas (420 000), Malasia (131 000) y Viet Nam (320 000). En 2021, la enfermedad seguía afectando a Brasil, Colombia, Filipinas, Fiji, India, Islas Cook, Kenia, Paraguay, Perú, Reunión (Francia) y Viet Nam(5).

Durante 2022 se notificaron 2,8 millones de casos de dengue en las Américas, lo que representa un aumento de más del doble en comparación con los 1,2 millones notificados en 2021(6).

Los cuatro serotipos de dengue (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN- 4) circulan a lo largo de las Américas y en algunos casos circulan simultáneamente(7).

En el caso específico de Cuba, la primera gran epidemia de dengue en el siglo XX se notificó en 1977, la cual fue causada por el VDEN-1. Se plantea que dicha epidemia comenzó a finales de octubre de ese año en la región oriental del país, extendiéndose posteriormente de forma rápida por todo el país. Se estima que se infectó aproximadamente el 50 % de la población, observándose un cuadro benigno de dengue(8,9).

En el periodo entre 1981-2006 ocurrieron cuatro grandes epidemias de dengue hemorrágico en el país. La epidemia de 1981 durante la cual se reportaron 344 303 casos, de ellos 10 312 graves y muy graves, y 158 fallecidos (de ellos 101 niños); causada por el VDEN-2(10). La otra gran epidemia producida por VDEN-2

fue la de 1997 en Santiago de Cuba con 3012 casos confirmados, de ellos 205 clasificados como fiebre del dengue (FHD)/ síndrome del choque del dengue (SCD) y 12 de ellos fueron casos fatales(11). Más tarde en el periodo 2001-2002 ocurrió una epidemia de VDEN -3 mayormente en Ciudad de la Habana con 14 446 casos confirmados, 81 FHD/SCD y 3 fallecidos(12). La última fue en el 2006 que afectó a varias provincias del país, causada por los serotipos de VDEN-3 y VDEN-4(13,14).

Posteriormente en el periodo 2007-2017 han ocurrido brotes de dengue causados por los serotipos VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4, los cuales han sido controlados. En los últimos años se ha identificado el VDEN-1, simultáneamente con el serotipo VDEN-2(9,15). De ellos, destacar que en el año 2020, VDEN-1 prevaleció sobre VDEN-2, mientras que en el año 2021 fue VDEN-2 el serotipo con mayor circulación. En el año 2022, coincidiendo con la apertura de la frontera luego de la pandemia de COVID a finales del 2021, se reportó la circulación en el país de los 4 serotipos de dengue. En un 78,2% de las muestras recolectadas se identificó VDEN-3, en un 12% VDEN-2, 7,1% VDEN-1 y 2,8% VDEN-4(Publicación enviada).

Teniendo en cuenta lo anterior, resulta de gran importancia la caracterización biológica y molecular de los serotipos que con mayor frecuencia han circulado en nuestro país, en el periodo 2020-2022. Aunque este tema ya ha sido abordado por otros autores, cabe destacar que desde el año 1977 no se realiza en Cuba la caracterización biológica de VDEN-1, ya que este serotipo no circulaba en el país de forma epidémica desde 1977, por lo cual se realizó un estudio descriptivo con el objetivo principal de caracterizar biológica y molecularmente los aislamientos de virus dengue 1 en Cuba en el periodo 2020-2022.

Se plantea la siguiente hipótesis:

Las características biológicas y moleculares de los aislamientos de virus VDEN-1 en Cuba en el periodo 2020-2022 coinciden con las de otros serotipos virales que han circulado en el país, lo cual influye en el cuadro clínico de la enfermedad.

II. MARCO TEÓRICO

II.MARCO TEÓRICO

II.1. Características generales de los Flavivirus: VDEN

La familia *Flaviviridae* está compuesta por virus pequeños y envueltos con genoma de simple cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva (9 a 13 kb). Esta familia consta de cuatro géneros: *Hepacivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* y *Orthoflavivirus*. Es característica distintiva de los miembros del género *Orthoflavivirus* la presencia de una caperuza tipo I (m⁷GpppAmp) en el extremo 5' de su genoma, no identificada en los virus de otros géneros(16).

La mayoría de los miembros de este género, que incluye a 53 especies, son virus transmitidos por artrópodos, con distintos grupos que infectan a mosquitos o garrapatas, cuyos huéspedes primarios habituales son los mamíferos y las aves; provocando infecciones que varían desde asintomáticas hasta fiebre hemorrágica grave o mortal o enfermedades neurológicas(16). Los patógenos humanos importantes incluyen el virus del dengue (VDEN), el virus de la fiebre amarilla, el virus del Zika, el virus de la encefalitis japonesa, el virus del Nilo Occidental y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas(17).

La clasificación correspondiente al VDEN se describe de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus(18)

Familia: *Flaviviridae*

Género: *Orthoflavivirus*

Especie: *Orthoflavivirus denguei*

El virus se clasifica en cuatro serotipos en función de sus diferencias antigénicas y genéticas: Dengue virus tipo 1 al tipo 4 (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4)(19).

Estudios filogenéticos de aislados de VDEN han permitido caracterizar genotipos dentro de cada serotipo, basados en la diversidad genética y la distribución geográfica.

Se plantea que los genotipos difieren entre sí en un 3 y 6 % a nivel de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente. Hasta el momento se han descrito cinco genotipos para el VDEN-1, seis genotipos para VDEN-2, cuatro genotipos para VDEN-3 y VDEN-4(20).

II.2. Estructura viral y genoma

El virus del dengue presenta una morfología icosaédrica. Se encuentra conformado por una membrana lipídica derivada de las células huésped. Sobre esta membrana, se insertan las proteínas de membrana y envoltura. En el interior del virus está el complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral(21).

El genoma viral se caracteriza por una partícula esférica de 40-50 nm cubierta por una envoltura de glicoproteína y ARN mensajero de sentido positivo único de aproximadamente 11 kb de longitud. En el marco abierto de lectura se codifican dos tipos de proteínas, lo cual permite su división en dos regiones; el que codifica las proteínas estructurales: cápside (C), proteína de membrana (prM) y envoltura (E); y el que codifica para las proteínas no estructurales o mejor conocidas como NS (non structural por su traducción al inglés): NS1 (46 kDa), NS2A (22 kDa), NS2B (14 kDa), NS3 (70 kDa), NS4A (16 kDa), NS4B (27 kDa) and NS5 (103 kDa)(22).

De manera tal, que los genes del VDEN se encuentran organizados del siguiente modo: 5' – C – prM – E – NS1 – NS2A – NS2B– NS3 – NS4A/2K – NS4B – NS5 y 3'(23,24).

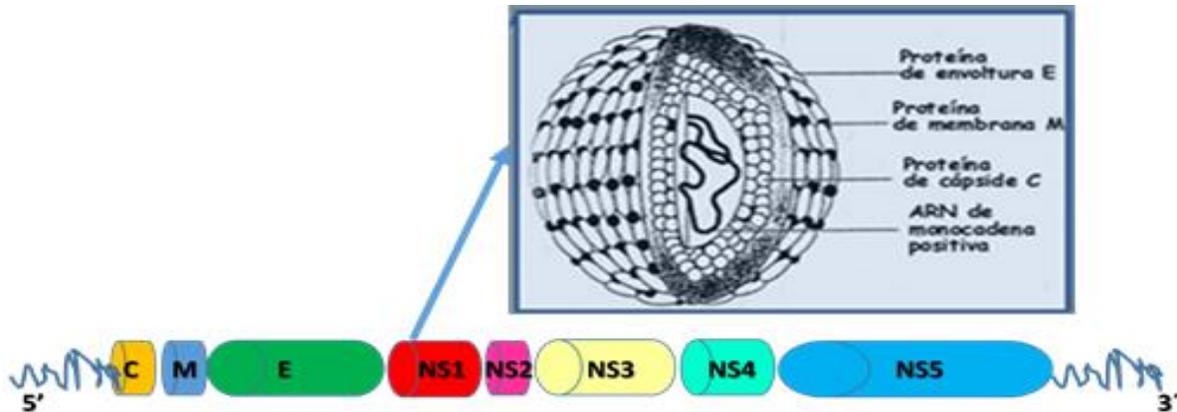


Figura 1. Virus dengue: estructura y genoma(24).

II.3. Proteínas estructurales

La proteína C es la proteína de la cápside que posee una estructura secundaria con cuatro hélices alfas con diferentes funciones, pesa 11 KDa, aproximadamente. Se ancla a la membrana del retículo endoplásmico mediante dos de sus hélices que poseen características hidrofóbicas. Otra hélice con carácter básico localizada en la cara citoplásmica se ancla al RNA genómico recién sintetizado formando la nucleocápside. La última hélice que posee características también hidrofóbicas promueve la estabilización de la nucleocápside y el reclutamiento de gotas lipídicas del citoplasma, promoviendo la formación de la partícula viral(25).

La proteína precursora de membrana (prM), con un peso molecular de 26 KDa, se encuentra presente en viriones inmaduros, la cual es procesada durante el transporte de los viriones vía trans-Golgi por la proteasa celular furina, generando el péptido pr y la proteína M, y con ello la maduración del virión(26).

La proteína E, es la proteína de envoltura que se encuentra en la superficie del virus formando complejos homodiméricos de típico cabeza-cola. Además, es la única proteína viral que interactúa con el receptor de membrana celular y es el principal inmunógeno del virus, ya que estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizantes(27).

II.4. Proteínas no estructurales

La NS1 es una glicoproteína que existe asociada a la célula, en el retículo endoplásmico unida al complejo de replicación viral, en la superficie celular y en forma extracelular. Esta glicoproteína presenta determinantes antigénicos específicos de serotipo y de grupo. La función de la NS1 en la replicación viral no está completamente aclarada. La forma extracelular provoca respuestas inmunes humorales fuertes. La proteína NS1, a pesar de no generar anticuerpos neutralizantes, si genera respuesta humoral prolongada e inmunidad celular, mediada principalmente por la actividad de linfocitos TH2 y TH1, que inducen predominante anticuerpos IgG clase 1, el cual se asocia con la activación del complemento, e independientemente del tipo de respuestas inmune que genera, NS1 induce la secreción de citoquinas como lo son IFN- γ e IL-10(28).

La NS2 está constituida por dos proteínas NS2A y NS2B. Puede encontrarse atravesando la membrana y ha sido localizada en posibles sitios de replicación del ARN. Esta proteína participa en el ensamblaje del virión. Además presenta epitopos de células T y en el virus VDEN-2 se ha observado que actúa como antagonista del interferón (INF) mediante la inhibición de la señal que estimula su producción. La proteína NS2B está asociada a la membrana y forma un complejo con NS3, constituyendo un cofactor requerido para la función de serina proteasa de NS3(29,30).

La NS3 es la segunda proteína más grande del virus (70 kD), altamente conservada entre los flavivirus (67%) y su estructura se divide en tres dominios. Se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de replicación del ARN viral. Es una proteína multifuncional, con actividad de serina proteasa, helicasa y nucleótido trifosfatasa. Se ha demostrado que es fuente principal de epítomos de linfocitos T citotóxicos; además puede inducir apoptosis. Algunas mutaciones en esta proteína pueden disminuir sus funciones, lo que abre un camino para el diseño de inhibidores antivirales alostéricos(31,32). En tejido humano la NS3 se ha encontrado en el bazo, ganglios linfáticos, macrófagos alveolares, hepatocitos y células perivasculares del cerebro(33).

La proteína NS4 da origen a NS4A y NS4B, proteínas relativamente pequeñas. NS4A es una proteína asociada a membrana, que consiste en cuatro hélices transmembranales y una región citosólica N-terminal. Se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a membranas celulares(34). NS4B es una proteína integral que posee cinco dominios transmembrana, se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo(35). Se ha descrito que NS4B antagoniza la acción antiviral del INF- β (36).

La NS5 es la más grande de las proteínas no estructurales, y conservada entre las proteínas de los Flavivirus, con una identidad de secuencia del 70% entre los cuatro serotipos. Es una proteína básica que funciona como ARN polimerasa ARN dependiente y metiltransferasa en la metilación de la caperuza del extremo 5' del ARN viral. Se ha demostrado la inducción por NS5 de la transcripción y traducción de la IL-8 favoreciendo la diseminación viral. También puede inhibir la respuesta inmune del interferón, mediante la interacción con el transductor de señal y activador de la transcripción 2 (STAT2) o por modulación del empalme del RNA dentro de la célula huésped(17,19, 22).

II.5. Ciclo replicativo

La primera interacción de los Flavivirus con las células humanas, está mediada por la proteína E que interactúa con varios receptores de superficie celular y otros factores de unión. Se ha demostrado que la ubiquitinación de la proteína E es un determinante importante de la entrada del virus, el tropismo y la patogénesis(38). En el caso particular del VDEN se han descrito como receptores: los glucosaminoglucanos, lectinas tipo C como DC-SING, receptores de manosa, receptores de fosfatidilserina o proteínas de la inmunoglobulina-mucina de linfocitos T(39,40). Una vez unido, el virión se internaliza a la célula por endocitosis mediada por clatrina y es transportado a endosomas tempranos o intermedios. En los endosomas, el bajo pH induce cambios conformacionales profundos en la proteína E que llevan a la fusión de la envoltura lipídica del virión con la membrana del organelo y a la subsecuente liberación de la nucleocápside

al citoplasma celular. El desensamblaje de la cápside es un proceso poco conocido, que termina con la liberación del genoma viral en el citoplasma y su traducción a proteínas en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER). Dada su naturaleza monocistrónica, el genoma es traducido como una poliproteína, procesada por la proteasa viral NS3 y proteasas del hospedero (algunas aún desconocidas), para generar las tres proteínas estructurales C, prM y E, y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Estas últimas cumplen funciones durante la replicación viral y además modulan la respuesta innata de la célula(41–43).

La replicación del genoma viral se lleva a cabo en invaginaciones de la membrana del RER, que el propio virus induce, conocidos como paquetes vesiculares o VP(29). Dentro de los VP se encuentran las proteínas NS3 y NS5 formando un complejo. La proteína NS3 posee una función catalítica como proteasa, pero presenta también funciones de helicasa; por su parte, la proteína NS5 es la polimerasa viral ARN dependiente de ARN, y posee además actividad de metiltransferasa(29,42,43). También asociada a los VP, pero por el lado del lumen del RER, se encuentra la proteína NS1, presumiblemente cumpliendo funciones de andamiaje para el complejo replicativo(29,44,45). Finalmente, embebidas en la membrana del RER se encuentran las proteínas NS4A y NS4B, las cuales son responsables de inducir la curvatura de la membrana(29,46). Una vez que el genoma ha sido replicado a través de intermediarios de replicación de ARN de doble cadena, el proceso de ensamblaje comienza con la asociación de dímeros de la proteína C con el ARN viral progenie, seguido de la gemación de membranas del RER que contienen el complejo glucoproteínico prM-E. Durante el ensamblaje y la liberación de las partículas nacientes, proteínas del hospedero regulan el tráfico intracelular y la adición y procesamiento de azúcares a la glucoproteína E.

Posterior al ensamblaje, los viriones inmaduros se transportan por medio de la vía secretora clásica o constitutiva, a través del aparato de Golgi hacia el espacio extracelular. El último paso en la maduración del virión es un reordenamiento de prM-E debido al pH ácido del Golgi y a la acción de una proteasa residente de

Golgi llamada furina. Las partículas virales se liberan de la célula mediante exocitosis(43,46,47).

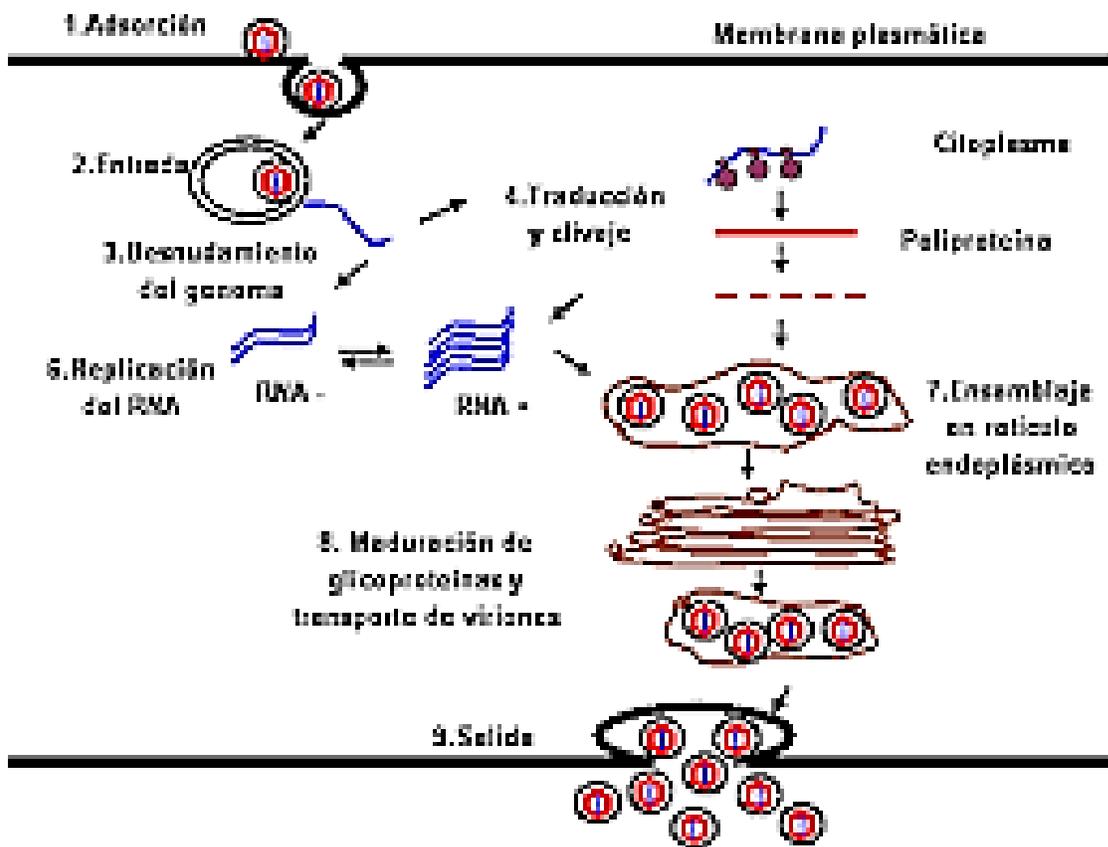


Figura 2. Esquema del ciclo replicativo del VDEN(48).

II.6. Serotipos y subtipos genéticos: VDEN

El VDEN está representado por cuatro serotipos (VDEN-1 al 4), relacionados serológicamente, pero antigénicamente distintos. En octubre del 2013 fue descubierto el serotipo VDEN-5, aislado de un paciente tailandés, confirmado mediante pruebas serológicas. Este serotipo sigue el ciclo selvático a diferencia de los otros cuatro serotipos que siguen el ciclo humano(23,49,50). Cada serotipo a su vez se divide en genotipos, basados en la comparación de la secuencia del gen que codifica para la proteína E. Se clasifican en genotipos diferentes aquellas cepas de DEN-1, DEN-2 y DEN-3 cuyas secuencias muestran una divergencia mayor del 6% y para los genotipos de DEN-4 la divergencia es menor del 8%. Se han identificado 5 del VDEN 1, 6 del VDEN 2 y 4 del VDEN 3 y VDEN 4,

respectivamente. Se plantea que esta diversidad puede atribuirse a su RNA polimerasa, ya que al no tener actividad de corrección de pruebas, se piensa que produce al menos una mutación por cada replicación de su genoma(4,51).

Tabla 1. Distribución de los serotipos y genotipos del VDEN(52).

| Serotipo | Genotipo | Distribución |
|----------|--------------------|---|
| 1 | I | Sureste de Asia, China y Este de África |
| | II | Tailandia |
| | III | Malasia |
| | IV | Islas del Pacífico Oeste y Australia |
| | V | América, Oeste de África y Asia |
| 2 | Asiático I | Malasia y Tailandia |
| | Asiático II | Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas |
| | Cosmopolita | Australia, África, islas del Pacífico, India y Este Medio |
| | Americano | Latinoamérica, Caribe, India e Islas del Pacífico |
| | Asiático Americano | América, Tailandia y Vietnam |
| | Selvático | Este de África y Sureste de Asia |
| 3 | I | Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico sur |
| | II | Tailandia, Vietnam y Bangladesh |
| | III | Sri Lanka, India, África, Samoa y Tailandia |
| | IV | Puerto Rico, Latinoamérica y Tahití |
| 4 | I | Tailandia, Filipinas, Sri Lanka, Japón y Brasil |
| | II | Indonesia, Malasia, Tahití y América |
| | III | Tailandia |
| | IV | Malasia |

II.7. Patogénesis de la infección por el VDEN

Cuando un mosquito *Aedes* infectado con el VDEN introduce su saliva dentro de la piel del humano, las partículas virales son liberadas en la dermis y las células dendríticas de Langerhans las interiorizan, lo que contribuye a la diseminación del virus cuando estas migran a los ganglios linfáticos, infectando los macrófagos residentes y otras células, estas transportan el virus al sistema linfático y vascular, produciendo infección en la médula ósea, el bazo y numerosos órganos no

linfoides como el estómago, el timo, los pulmones, el cerebro, el tracto gastrointestinal, el hígado, los riñones y el corazón(33).

Existen diversos factores que desempeñan un papel en las patogénesis de las infecciones dependientes del virus como del huésped, a los cuales se les atribuye la aparición de las manifestaciones graves del dengue. Dichos factores son: el antígeno viral de NS1, la variación del genoma del VDEN, el ARN subgenómico, la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE: *antibody-dependent enhancement*), las células T de memoria con reacción cruzada y los anticuerpos anti-VDEN NS1 y la autoinmunidad(53).

La infección primaria causada por el VDEN suele ser asintomática o se manifiesta como una enfermedad febril leve, sin embargo, también puede causar cuadros clínicos graves en algunos pacientes(54).

Una segunda infección por dengue en niños mayores y adultos presentan un alto riesgo de enfermedad grave debido a ADE. En el caso de los niños nacidos de madres con infección por virus dengue previa, poseen mayor riesgo de sufrir enfermedad severa aproximadamente 4 a 12 meses después del nacimiento, seguido de un disminución del riesgo de enfermedad grave desde aproximadamente los 12 meses después del nacimiento(55).

La infección con un serotipo de dengue induce una inmunidad homotípica de por vida y provoca también la formación de anticuerpos heterotípicos que reaccionan cruzadamente con el resto de los serotipos, a corto plazo.

Está claro que las células del sistema inmunológico y las células endoteliales (CE) que recubren los vasos sanguíneos desempeñan un papel vital en el tropismo del VDEN y en la patogénesis grave.

Durante la infección por virus del dengue el sistema inmune responde con la producción de diversas citocinas proinflamatorias, las cuales están relacionadas con la patogenia de la enfermedad. La proteína viral NS1 es reconocida por los receptores tipo toll TLR2 y TLR6 los cuales contribuyen con la expresión de

citocinas proinflamatorias(56). En especial los macrófagos se convierten en uno de los principales productores de citoquinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α . Particularmente el TNF- α se relaciona con las manifestaciones hemorrágicas al favorecer la trombocitopenia y la disfunción endotelial(57).

Las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos TCD4 los cuales se activan y cooperan con los linfocitos B produciendo respuesta de anticuerpos. La respuesta de anticuerpos constituye un elemento crítico en la patogenia de la enfermedad(58). Está demostrado que los anticuerpos producidos contra una cepa no necesariamente son neutralizantes, esto se debe a diferencias entre los epítopes del dominio III de las proteínas de la envoltura(59). Los anticuerpos no neutralizantes favorecen la entrada de los virus a las células mononucleares con lo cual se amplifica la infección(60).

Adicionalmente la acción de estos anticuerpos heterólogos provoca la activación del complemento por la vía clásica con el aumento de anafilotoxinas (C3a y C5a) que constituyen un importante mediador del aumento de la permeabilidad vascular(61). Por otra parte, estos anticuerpos están implicados en la aparición de los fenómenos hemorrágicos, pues se ha descrito que existe reactividad cruzada contra las plaquetas, células endoteliales y proteínas plasmáticas relacionadas con la cascada de la coagulación(62).

El virus del dengue puede infectar directamente las células progenitoras en la médula ósea, de esta manera suprimir la hematopoyesis; adicionalmente la formación de anticuerpos que reconocen por reacción cruzada estructuras de las plaquetas contribuye con la trombocitopenia característica de esta enfermedad; ambos efectos contribuyen con la aparición de hemorragias pues disminuye la producción de plaquetas y aumenta su destrucción en periferia(63).

Adicionalmente el virus del dengue infecta provocando apoptosis y liberación de citocinas proinflamatorias. Estos eventos traen como consecuencia disfunción

endotelial y aumento de la permeabilidad vascular lo que facilita la aparición de fenómenos hemorrágicos(64).

Finalmente durante la infección por el virus del dengue ocurre necrosis de los hepatocitos secundaria a la infiltración de este órgano por células del sistema inmune como linfocitos T citotóxicos y los NK, las cuales destruyen los hepatocitos infectados. Como consecuencia de este hecho en los pacientes se elevan las aminotransferasas y el hígado disminuye su capacidad de producir factores de la coagulación y proteínas plasmáticas lo cual contribuye de manera decisiva a la aparición de fenómenos hemorrágicos(65).

Por otra parte, se asume que los virus del DEN varían genéticamente como resultado de las presiones de selección apareciendo las cuasiespecies in vivo, aunque se desconoce el grado de diversidad y la posibilidad de no estar representadas en el aislamiento involucradas en el incremento de la virulencia. Estas mutaciones en el genoma del virus pueden conducir a una replicación aumentada del virus con una consecuente carga viral alta, un incremento de la severidad de la enfermedad y un potencial epidémico elevado(66).

II.8. Consideraciones clínicas

La OMS establece que la enfermedad tiene dos formas de presentación: dengue y dengue grave. Se identifica a un caso sospechoso de dengue como la persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre aguda habitualmente de 2 a 7 días de evolución, y dos o más de las siguientes manifestaciones: náusea/vómitos, exantema, cefalea/dolor retro-orbitario, mialgia/artralgia, petequias, prueba de torniquete positiva o leucopenia; a su vez, esta puede presentar o no cualquier signo de alarma(67).

La enfermedad se divide en tres fases clínicas: la primera fase, llamada fase febril, comienza después de un período de incubación de 2 a 8 días, en el que puede aparecer un cuadro febril inespecífico, la forma típica se expresa con síntomas como fiebre alta, cefalea (especialmente retro-ocular), mialgias y artralgias(68). Además, puede ocurrir inflamación de los ganglios linfáticos y erupciones en la piel

que pueden ir desde un rash exantemático escarlatiniforme hasta francas petequias, aunque en hasta el 80 % de los casos la enfermedad puede ser asintomática o leve, incluso pasando desapercibida(69).

La desaparición de la fiebre, da inicio a la fase crítica, donde aparecen los signos de alarma de la enfermedad como dolor abdominal, vómito, sangrado de mucosas, alteración del estado de consciencia, trombocitopenia, y las manifestaciones de daño de órgano (hepatopatías, miocarditis, encefalopatía), el shock por extravasación de plasma o el sangrado severo (normalmente asociado a hemorragias de vías digestivas). Si el paciente sobrevive a esta fase, la siguiente es la fase de recuperación, que puede durar desde unos días hasta varios meses y en la cual hay una elevación del recuento plaquetario y de linfocitos, estabilización hemodinámica y restablecimiento del resto de las funciones del organismo(70).

II.9. Diagnóstico virológico de la infección por el VDEN

Existen varios métodos para el diagnóstico virológico de la infección por el VDEN. Estos pueden clasificarse como directos, si identifican las partículas virales completas o proteínas que actúan como antígenos; o indirectos si identifican la respuesta inmune que induce la infección por el virus (presencia de anticuerpos específicos). También se pueden clasificar de acuerdo con su fundamento en técnicas de aislamiento viral, inmunológicas y moleculares(9).

De manera general, se utilizan como muestras para el diagnóstico virológico de la infección por el VDEN: suero, plasma, sangre entera, líquido cefalorraquídeo (pacientes con infección presuntiva y con manifestaciones clínicas en el sistema nervioso central, como encefalopatía y meningitis aséptica), así como tejidos fijados de hígado, riñón, bazo y pulmón, útiles para diagnóstico *post mortem*(71).

II.9.1. Técnicas de aislamiento viral e identificación viral

Cuatro sistemas de aislamiento viral han sido usados para el virus dengue, inoculación intracerebral en ratones de 1-3 días de edad, cultivos de células de

mamíferos, inoculación intratorácica de mosquitos adultos y el uso de cultivos de células de mosquito(2,72).

La inoculación intratorácica de mosquitos es la técnica de mayor sensibilidad para el aislamiento del VDEN mientras que la inoculación de ratones lactantes por vía intracerebral, ha sido de los sistemas biológicos el más empleado en el aislamiento del virus dengue, a pesar de su baja sensibilidad(72).

Se han empleado líneas celulares de mamíferos como la Vero (riñón de mono verde africano), BHK-21 (riñón de hámster recién nacido), LLCMK2 (riñón de mono) para el aislamiento viral. Sin embargo, las líneas celulares obtenidas de mosquitos son las más sensibles y de amplio uso: AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Tra-284 (*Toxorhynchites amboinensis*), C6/36 (*Aedes albopictus*), AP64 y CLA-1 (clonos de una línea celular de *Aedes pseudoscutellaris*), NIV-AA-706 (obtenida de larvas de *Aedes Aegypti*). La sublínea celular C6/36HT (alta temperatura, del inglés -high temperature) está adaptada a crecer a 33° C y muestra una gran sensibilidad al virus DEN(73,74).

El aislamiento viral no se usa para el diagnóstico habitual ni es un requisito para la confirmación del diagnóstico, debido a la complejidad técnica, los costos y la bioseguridad necesaria para realizarla. Sin embargo, es importante aislar cepas cuyo genotipo y fenotipo se puedan caracterizar y que puedan servir como referencia y controles para las pruebas serológicas y moleculares.

Como método de elección para la identificación del VDEN se encuentra: la IFA(*Indirect Fluorescent Antibody*), ; con anticuerpos monoclonales seroespecíficos, producidos en cultivos tisulares o líquido ascítico de ratones e IgG conjugada fluoresceína-isotiocianato(2).

II.9.2. Técnicas serológicas

Los métodos serológicos se basan en la detección de la respuesta inmunitaria a la infección viral, en particular, los anticuerpos que se detectan principalmente en suero y LCR en los casos de enfermedad neurológica. La sensibilidad de los

métodos serológicos depende, sobre todo, de la dinámica temporal de la producción de anticuerpos(75,76).

Puede hacerse por: prueba de inmunocaptura enzimática de la inmunoglobulina M (MAC-ELISA) e inmunoglobulina indirecta G (ELISA). inhibición-hemaglutinación (IH), fijación de complemento (FC), neutralización por reducción de placas (PRNT) y detección de antígeno de proteína no estructural del dengue (NS1 ELISA)(2).

Se han desarrollado diferentes ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA), (del inglés -enzyme linked immunosorbent assay) para la detección de IgM e IgG en el diagnóstico del VDEN. Estos sistemas son económicos, rápidos, fáciles de ejecutar y muestran a su vez sensibilidad y especificidad elevada. La sensibilidad de la IgM se encuentra entre un 90 a 97% comparado con la IH. Algunas reacciones falso-positivas pueden observarse en menos del 2% de los casos(77).

Durante una infección primaria, los individuos desarrollan IgM después de 5–6 días y anticuerpos IgG luego de 7–10 días. En la infección secundaria los niveles de IgM son más bajos y en algunos casos ausentes y los niveles altos de IgG son detectables incluso durante la fase aguda. Ellos están presentes por dos y tres meses. Los títulos altos de IgG son un criterio de infección secundaria(77,78).

El método de ELISA de inhibición (MEI) permite la detección y titulación de las inmunoglobulinas totales contra el VDEN. De esta forma empleando sueros pares es posible clasificar el caso como primario o secundario(9).

La detección de anticuerpos neutralizantes mediante la PRNT, es considerada el ensayo de referencia para la detección serológica de infecciones arbovirales(79).

La PRNT, al igual que otras pruebas de neutralización, se basa en la capacidad de los anticuerpos séricos de las personas infectadas de inhibir (es decir, neutralizar) la infección viral en cultivos celulares. Proporciona el parámetro biológico de la neutralización del virus *in vitro*. Además es la prueba serológica más específica entre los flavivirus, y serotipo-específica entre los VDEN. Este método correlaciona los niveles de protección del suero frente a la infección(80,81).

La IH y la FC no permiten la determinación del serotipo infectante. Frecuentemente es difícil de establecer el serotipo infectante específico debido a las reacciones cruzadas en los pacientes con inmunidad heterotípica preexistente. En el caso de infecciones del VDENV secuenciales, la respuesta de anticuerpo al virus infectante inicial puede exceder a la del tipo infectante actual (pecado original)(32,78).

II.9.3. Técnicas moleculares

En los últimos años ha aumentado el número de investigaciones en las que se usan métodos moleculares, ya que estos facilitan la detección y diagnóstico oportuno de la infección por VDENV.

Las técnicas moleculares permiten la detección directa del virus y el resultado se obtiene en poco tiempo, por lo que son más sensibles y específicas, si las comparamos con otros tipos de técnicas como las celulares y serológicas. Constituyen una herramienta de gran importancia para la vigilancia epidemiológica, específicamente para la serotipificación y la determinación de los serotipos circulantes, ya que las técnicas moleculares pueden ser más confiables que las basadas en anticuerpos, debido a que estas últimas pueden presentar reacciones cruzadas con otros serotipos o incluso con virus de otras familias(82,83).

Entre las técnicas moleculares se destaca la PCR con transcripción reversa (RT-PCR), usada solo para la serotipificación, y la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), usada para la serotipificación y para la evaluación de la carga viral. La RT-PCR consiste en una transcripción reversa inicial, en la que el ARN viral, mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, se convierte en ADN copia, y a partir de éste se realiza una PCR convencional en la que se amplifica una región conservada del genoma del virus dengue(84–86).

La RT-PCR es la técnica molecular que más se utiliza en los estudios de detección del virus en cualquiera de sus serotipos circulantes(84).

La RT-RCP convencional constituye un método sensible, específico y muy rápido para el diagnóstico del VDEN. La RT-RCP puede detectar el ARN viral en muestras de suero, células de cultivo, sobrenadantes celulares, mosquitos, larvas infectadas, así como muestras de tejidos frescos y fijados con formalina e incluidos en parafina tomadas de fallecidos(73).

La qRT-PCR combina los principios de una PCR convencional con el uso de marcadores fluorescentes. En el caso del virus dengue, esta técnica comparte los primeros pasos de una RT-PCR convencional: extracción de ARN y transcripción reversa, pero el “punto final” es diferente, pues no necesita visualización en un gel sino que se observan las curvas de amplificación y se obtiene un resultado cuantitativo(87). En esta técnica se emplean cebadores específicos para cada serotipo del virus dengue y fluorocromos como I SYBR Green o sondas tipo TaqMan marcadas con fluorocromos, los cuales emiten fluorescencia a medida que se amplifica el genoma viral presente en la muestra. Por esta razón, la cantidad de fluorescencia que se emite es proporcional a la cantidad de ADN copia inicial de la muestra. Esta prueba puede ser de tipo “singleplex”, en la que se detecta un solo serotipo o “multiplex”, en la que se identifican los cuatro serotipos(88,89).

Esta prueba ha demostrado que no sólo es más rápida que la convencional, sino que presenta mayor sensibilidad y permite la cuantificación de los ácidos nucleicos amplificados convirtiéndose en una herramienta muy útil para la determinación del rol de la viremia en la patogénesis del VDEN(90).

Actualmente, también ha ocurrido el desarrollo de técnicas moleculares como la secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing [NGS]), la cual ha permitido secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base. Es una tecnología de secuenciación de ADN en paralelo profunda y de alto rendimiento y constituye un enfoque poderoso que ha mejorado la detección de patógenos para aplicaciones de diagnóstico y vigilancia(91).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Objetivo General

1. Caracterizar las propiedades biológicas y moleculares de los aislamientos de VDENV-1 en Cuba, 2020-2022.

Objetivos específicos

1. Describir el efecto citopatogénico y la cinética de multiplicación viral en diferentes líneas celulares de mosquitos.
2. Determinar el tamaño de las placas virales y evaluar la neurovirulencia en ratones lactantes.
3. Caracterizar molecularmente los aislamientos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Tipo de investigación, diseño de estudio y contexto

Se realizó un estudio descriptivo con base en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus, del Departamento de Virología, del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La investigación pertenece al Proyecto Dengue en Cuba 2017-2021.

IV.2. Definición de universo

Formaron parte del universo 5 de los aislamientos de VDEN-1 identificados en el período del 2020-2022, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus, del Departamento de Virología, del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

IV.3. Consideraciones Éticas

El presente estudio se enmarca dentro del proyecto de ciencia y técnica Proyecto Dengue en Cuba 2017-2021, aprobado por los comités Científico y de Ética Médica del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (Anexo 1, 2). El estudio se realizó de acuerdo a los principios éticos expresados en la Declaración de Helsinki(92). En lo que refiere al correcto cuidado y manejo de los animales de experimentación se siguió lo dispuesto por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) que se basa en las pautas internacionales para las investigaciones biomédicas de este tipo. En su contenido se considera la protección del bienestar animal, el control del estrés, el dolor y el punto final humanitario. Para ello se utilizaron como referencia las guías siguientes:

- DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos(93).
- Regulación No. 64/13 Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los comités institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL)(94).

- Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, biomédicos y legales(95).

IV.4. Cepas virales

En la tabla 2 se presentan la características de las cepas virales empleadas en el estudio.

Tabla 2. Datos de interés de las cepas VDEN-1 empleadas en el estudio.

| Cepas virales VDEN-1 | Clasificación clínica | Historia de pases | Lugar de aislamiento | Año de aislamiento |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------|--------------------|
| 219/20 | Dengue sin signos de alarma | 1P Vero E6/3P C636 HT/2BHK21 | La Habana | 2020 |
| 872/20 | Dengue sin signos de alarma | 1P Vero E6/3P C636 HT/2BHK21 | La Habana | 2020 |
| 888/20 | Dengue con signos de alarma | 1P Vero E6/3P C636 HT/2BHK21 | La Habana | 2020 |
| 520/21 | Dengue sin signos de alarma | 1P Vero E6/3P C636 HT/2BHK21 | La Habana | 2021 |
| 636/22 | Dengue con signos de alarma | 1P Vero E6/3P C636 HT/2BHK21 | La Habana | 2022 |

IV.5. Líneas celulares

Fueron utilizadas las líneas celulares de mamíferos y mosquitos. La línea celular de mamífero fue la BHK-21, mientras las de mosquitos fueron las C6/36 HT y las AP61.

La línea celular BHK-21 clono 15 (riñón de Hámster) obtenida a partir de la línea BHK-21 clono 13 (ATCC 1992) y donada al laboratorio de Arbovirus por el Prof.

S.B. Halstead (Director Científico de la Iniciativa para la Vacuna Pediátrica de Dengue) se empleó en la técnica de placas para la titulación viral y la determinación de anticuerpos neutralizantes. Las células se cultivaron a 37 °C en frascos plásticos estériles de 75 cm² con medio MEM suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X) y 10% de SFBI. Las células se pasaron semanalmente a una razón de pase de 1:8. Para la realización de ambas técnicas se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 2 x 10⁵ células/mL.

Línea celular de mosquito C6/36 HT (*Aedes albopictus*), obtenida por Kuno y Oliver en 1989 a partir de la línea celular C6/36 de Igarashi y donada a nuestro laboratorio por el Dr.J.Díaz del Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia, empleada para la evaluación de la cinética de crecimiento viral creció en MEM, suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (100X), 2mM de glutamina, antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomycin 100 mg/mL) y 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado.

La línea celular AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) donada por el profesor M.G.R. Varma del London School of Tropical Medicine and Hygiene, la cual crece a 28°C en medio MM/VP-12, suplementado con SFBI 10 %. El medio de mantenimiento consistió en medio L-15 con 10 % de una solución de caldo triptosa fosfato 2,9 % y SFBI 2 %.

Todas las líneas celulares fueron suministradas por el Laboratorio de Cultivo de Células del IPK.

IV.6. Preparación de los lotes virales de los aislamientos de VDEN-1.

1. Se inocularon frascos plásticos estériles de 25 cm² con monocapa confluyente de células C6/36 HT de 24 a 48 h de sembradas, con 500 µL de la dilución de las cepas de VDEN-1 utilizadas en el estudio. Todas las cepas presentaban un pase en C6/36 HT se inocularon a una multiplicidad de infección de 0,01, empleando medio de mantenimiento (MEM, Gibco, EUA) con L-glutamina 200

nmol/l al 1%, SFBI al 2%, antibiótico (Penicillin 10.000 UI/ml y Streptomycin 10,000 µg/ml) al 1%.

2. Las monocapas celulares inoculadas se incubaron durante una hora a sus temperaturas respectivas para facilitar la entrada del virus a la célula.
3. Posteriormente se añadieron 5 mL de medio de mantenimiento a cada uno de los frascos plásticos.
4. Los cultivos infectados con las diferentes cepas se incubaron durante 7 días a las temperaturas correspondientes de acuerdo con la línea celular y se observaron diariamente a través de un microscopio invertido Olympus CK con aumento 40x para detectar la aparición del ECP.
5. Cuando la multiplicación viral se confirmó, los frascos plásticos fueron congelados a -86 °C previa adición de SFBI al 2%. Finalmente los cultivos se descongelaron de forma rápida a 37 °C y se distribuyeron en alícuotas de 200 µL.

IV.7. Determinación del título viral

Para la determinación del título infectivo de los aislamientos VDEN-1 se empleó la línea celular BHK-21.

1. Se prepararon diluciones seriadas en base 10 a las cepas virales desde 10^{-1} hasta 10^{-3} .
2. Se añadieron 0,5 mL de la suspensión de células BHK-21 a cada pozo de las placas plásticas estériles de 24 pozos. Las células se dejaron en reposo por una hora a temperatura ambiente.
3. Se inocularon 50 µL de cada dilución viral a las células y se incubaron durante cuatro horas a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5%.
4. Se añadieron 0,5 mL de medio Overlay y se incubaron a 37 °C por 7 días en incubadora de CO₂ al 5%.

Luego de la incubación se descartó el medio y las monocapas celulares se lavaron con agua corriente. A cada pozo de la placa plástica se le añadió 0,5 mL de la solución colorante Naphthol Blue Black (NBB). Después de 30

minutos lavar con agua de nuevo. Las placas pueden ser contadas inmediatamente o cuando se sequen(72).

Para conocer el título infectivo de los virus titulados se aplicó la siguiente fórmula:

Título (ufp/ml)= (P x Fd)/VI donde:

P: Promedio del número de placas virales obtenido en la dilución en que se contaron las mismas.

Fd: Representa la dilución viral en que se contaron las placas (Factor de dilución).

VI: Factor volumen de inóculo.

IV.8. Determinación de las propiedades biológicas de las cepas aisladas. Procedimientos.

IV.8.1. Efecto citopatogénico (ECP) en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61

Frascos plásticos estériles de 25 cm² con monocapa confluyente de células C6/36 HT y AP-61 se inocularon con las 5 cepas de VDEN-1 en estudio, a una multiplicidad de infección de 0.01. Luego de 1 hora de adsorción, se adicionaron 5ml de medio de mantenimiento. Después fueron incubadas por 7 días a sus respectivas temperaturas, observándose diariamente el ECP.

IV.8.2. Determinación del tamaño de las placas

Las placas virales fueron evaluadas según su tamaño. Se consideraron pequeñas todas aquellas con un diámetro ≤1 mm y grandes aquellas con un diámetro > 1 mm.

IV.8.3. Determinación de la neurovirulencia en ratones lactantes

Para la determinación de la neurovirulencia en ratones lactantes se emplearon 16 familias de 9 ratones lactantes de 24 h de nacidos, BALB/c procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24

°C), humedad (20-25 %), ciclo alternativo de luz /oscuridad de 12 horas, y recibieron alimentación y agua. La realización del procedimiento se efectuó en el Bioterio del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, cumpliendo con las guías internacionales y nacionales, mencionadas anteriormente, estipuladas en nuestro instituto y manteniendo las condiciones óptimas para dicho proceder, evitando todo daño innecesario.

Se inocularon por vía intracerebral con 0.02 ml de las diluciones seriadas en base 10 de las cepas diluidas en medio 199 con 2 % de SFBI. Los ratones se observaron diariamente por 21 días en busca de signos de enfermedad o muerte. El título viral se calculó con el método de Reed y Muench(96). La neurovirulencia se consideró de acuerdo con la relación DL50/título infectivo (ufp/mL). Las muertes ocurridas en las primeras 24 a 48 horas no fueron consideradas a los efectos del estudio.

IV.9. Determinación de las propiedades moleculares de las cepas aisladas.

Procedimientos.

A partir de los lotes virales de cada cepa se realizó extracción de ARN y PCR a punto final del protocolo ViGenDA para amplificar el producto de TR-PCR, se comprobó el producto de este mediante electroforesis en gel de agarosa y se realizó la purificación del mismo. Posteriormente se obtuvo la reacción de secuencia, se purificó y finalmente se obtuvieron las secuencias de las cepas, estas fueron editadas en el programa Sequencher versión 4.10.1. (Anexo 3, 4)(97).

Para el análisis filogenético de las secuencias de VDEN 1 se empleó la plataforma NGphylogeny.fr, la cual realizó el alineamiento de las secuencias y construyó el árbol filogenético empleando como mejor método de ajuste de los datos el modelo PhyML Newick tree. Se emplearon secuencias de VDEN-1 de Cuba de años anteriores y secuencias obtenidas de la base de datos GenBank.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los siguientes lotes virales a partir de los cuales se realizó la caracterización biológica y molecular de los aislamientos de VDEN-1 en Cuba en el periodo 2020-2022:

- ❖ 219/20 2P C6/36 HT
- ❖ 872/20 2P C6/36 HT
- ❖ 888/20 2P C6/36 HT
- ❖ 520/212P C6/36 HT
- ❖ 636/22 2P C6/36 HT

Titulación viral de VDEN-1 del período de 2020-2022

Se determinó el título infectivo de los aislamientos VDEN-1. Los mayores títulos virales se presentaron en los aislamientos 888/20 y 636/22, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Determinación del título infectivo de los aislamientos VDEN-1.

| Aislamientos VDEN-1 | Títulos virales (UFP/ml) |
|---------------------|--------------------------|
| 219/20 | 1.4×10^3 |
| 872/20 | 7.3×10^2 |
| 888/20 | 1.7×10^4 |
| 520/21 | 2.4×10^3 |
| 636/22 | 1.4×10^4 |

V.1. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS CEPAS VDEN-1

V.1.1. ECP en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61

La infección de cultivos de células de mosquitos con flavivirus puede manifestarse con un marcado ECP, caracterizado por una extensa fusión; aunque no todas las cepas son capaces de producir sincitios(98).

En nuestro estudio se observó de forma general que en las 5 cepas de VDEN-1, y en las dos líneas celulares empleadas, la formación de un ECP leve, dado por un aumento de la refractabilidad de las células y redondamiento de las mismas. En el caso de las cepas 219/20 y 636/22 se manifestó la formación de conglomerados de células, similares a sincitios, en ambas líneas celulares. Dichas cepas presentaron una mayor intensidad y rapidez en la aparición y desarrollo del ECP, pues al tercer día ya evidenciaban la forma de sincitios en el 25% de la monocapa celular, con una expresión máxima al séptimo día posinoculación. En cuanto a las otras cepas el ECP se evidenció al sexto día posinoculación. Todas las cepas fueron sometidas a igual número de pases. De manera general, se observó la presencia de 2 patrones de comportamiento, las cepas 872/20, 888/20 y 520/21 pudieron ser agrupadas por mostrar un ECP de progresión lenta, por su parte, las cepas 219/20 y 636/22 mostraron una progresión más rápida. Estas últimas se corresponden con el aislamiento que inició la transmisión de dengue en el 2020 y la otra con una cepa aislada en el 2022. Esto ha sido reportado para cepas de diferentes serotipos como VDEN-2 y VDEN-3 en estudios realizados por otros investigadores(99–101). No todas las cepas fueron capaces de producir sincitios, lo cual es una característica biológica inherente a cada cepa, pues fueron aisladas e inoculadas en las mismas líneas celulares y tenían la misma historia de pase al realizar el estudio.

Aunque actualmente se reportan líneas celulares linfocíticas para la multiplicación de virus dengue(102), siguen siendo las líneas celulares de mosquitos las más utilizadas para el aislamiento y multiplicación de estos, así como para su caracterización biológica.

V.1.2. Determinación del tamaño de las placas

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las placas virales según su tamaño. Las cepas 219/20, 872/20 y 888/20 se consideraron como grandes, con diámetros mayores a 1 mm, a diferencia de las cepas 520/21 y 636/22, que se consideraron como pequeñas con un diámetro menor a 1 mm. El momento de aparición de las placas fue igual para todas las cepas (séptimo día posinoculación), a pesar de mostrar diferencias entre ellas en la aparición del ECP y en su título infectivo.

Las placas pequeñas han sido consideradas como un posible marcador de atenuación y con cepas no productoras de un cuadro clínico de severidad(101,103). Sin embargo la cepa 636/22 se asoció a un cuadro clínico con signos de alarma.

En cuanto a las cepas con placas grandes, es importante destacar que la cepa 888/20 se caracterizó por el mayor título viral de las cepas en estudio, sin embargo presentó un ECP de progresión rápida.

Tabla 4. Determinación del tamaño de las placas.

| Aislamientos VDEN-1 | Tamaño placa viral |
|---------------------|--------------------|
| 219/20 | Grandes |
| 872/20 | Grandes |
| 888/20 | Grandes |
| 520/21 | Pequeñas |
| 636/22 | Pequeñas |

V.1.3. Determinación de la neurovirulencia en ratones lactantes

Todas las cepas de VDEN-1 del estudio mostraron un índice de mortalidad mayor del 50%. Pudo observarse que las familias de ratones inoculados con las cepas 219/20 y 888/20 mostraron el mayor índice de mortalidad; mientras que la cepa

V. ANÁLISIS Y DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS

520/21 mostró menor efecto de neurovirulencia a pesar de que el estudio se repitió en dos ocasiones. (Tabla 5)

Tabla 5. Determinación neurovirulencia en los ratones lactantes inoculados según el método de Reed y Muench.

| Aislamientos VDEN-1 | Dilución | Ratones inoculados | Sobrev. | Muertos | Total Sobrev. | Total Muertos | Relación | %Mortalidad |
|---------------------|------------------|--------------------|---------|---------|---------------|---------------|----------|-------------|
| 219/20 | 10 ⁻¹ | 9 | 0 | 9 | 0 | 27 | 27/27 | 100 |
| | 10 ⁻² | 9 | 0 | 9 | 0 | 18 | 18/18 | 100 |
| | 10 ⁻³ | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 | 9/9 | 100 |
| 872/20 | 10 ⁻¹ | 9 | 0 | 9 | 0 | 26 | 26/26 | 100 |
| | 10 ⁻² | 9 | 1 | 8 | 1 | 17 | 17/18 | 94 |
| | 10 ⁻³ | 9 | 0 | 9 | 1 | 9 | 9/10 | 90 |
| 888/20 | 10 ⁻¹ | 9 | 0 | 9 | 0 | 27 | 27/27 | 100 |
| | 10 ⁻² | 9 | 0 | 9 | 0 | 18 | 18/18 | 100 |
| | 10 ⁻³ | 9 | 0 | 9 | 0 | 9 | 9/9 | 100 |
| 520/21 | 10 ⁻¹ | 9 | 2 | 6 | 2 | 21 | 21/24 | 88 |
| | 10 ⁻² | 9 | 1 | 8 | 3 | 15 | 15/18 | 83 |
| | 10 ⁻³ | 9 | 2 | 7 | 5 | 7 | 7/12 | 58 |
| 636/22 | 10 ⁻¹ | 9 | 0 | 9 | 0 | 24 | 24/24 | 100 |
| | 10 ⁻² | 9 | 0 | 9 | 0 | 15 | 15/15 | 100 |
| | 10 ⁻³ | 9 | 3 | 6 | 3 | 6 | 6/9 | 67 |

Las cepas que mostraron un mayor porcentaje de mortalidad se correspondieron: a una cepa aislada al inicio del 2020 y la otra a un aislamiento procedente de un paciente con un cuadro clínico de dengue con signos de alarma. Se conoce que la neurovirulencia en ratones lactantes constituye un marcador fenotípico que indica una mayor virulencia de las cepas (99,104). En nuestro estudio es significativo que la cepa 219/20 fue aislada de un paciente con cuadro clínico de dengue sin signos de alarma y tuvo un 100% de mortalidad.

V.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS VDEN-1

V.2.1. Determinación de las propiedades moleculares de las cepas aisladas en el período 2020-2022.

Una vez obtenidas las secuencias de las 5 cepas de VDEN-1, aisladas en nuestro país en el período del 2020-2022, se realizó el alineamiento de las secuencias y se construyó el árbol filogenético (Figura 3). Para ello se emplearon secuencias de VDEN 1 de Cuba de años anteriores y secuencias obtenidas de la base de datos GenBank. Como resultado del análisis de la secuencia aminoacídica de las cepas de VDEN-1 en estudio se encontraron los cambios que se muestran en la Tabla 6. Solo la cepa 872/20 presentó en la posición 1730 el cambio de metionina por treonina, sin embargo fue la única cepa que no mostró el cambio de asparagina por ácido aspártico en la posición 1420. Las cepas 520/21 y 636/22 no presentaron el cambio de treonina por isoleucina en la posición 1322 (Tabla 6).

En el período 2020-2022 es la segunda vez que el VDEN-1 circula en el país de forma epidémica. Este serotipo no circulaba en el país desde 1977, donde el 44,6% de la población quedó inmune al mismo(105). En el período 2010-2014 solo se detectó este serotipo en casos importados (Guantánamo 2010 y La Habana 2013-2014)(9).

Al comparar la secuencia de los 5 aislamientos de VDEN-1 del período 2020-2022 con secuencias cubanas de casos importados del período de 2010-2014 y con secuencias de VDEN-1 de la región obtenidas de la base de datos de GenBank, se encontró que todas las cepas cubanas del estudio y las cubanas de períodos anteriores se encuentran dentro del genotipo V. Estos resultados son consistentes con lo que se conoce de VDEN-1 en Cuba y en otros países de América(106–109). Las cepas cubanas del estudio se agruparon en clados diferentes. Las cepas 219/20, 888/20, 520/21 y 636/22 presentaban una mayor homología con una cepa cubana secuenciada en el año 2022, originándose a partir de una cepa procedente de Venezuela del año 2015. La cepa 872/20 se agrupa en otro clado con una mayor homología con otras cepas cubanas correspondientes al año 2022. Los

clados en los que se agruparon las cepas del estudio tienen como ancestro común una cepa de Cuba del año 2010 (Figura 3).

Según la información brindada por el árbol filogenético se aprecia que la cepa de Cuba del año 2010 se dispersó por algunos países de Suramérica y posteriormente ocurrieron reintroducciones de esta misma variante en nuestro país.

Resulta significativo señalar que el aislamiento de VDEN-1 correspondiente a la epidemia cubana de 1977, se agrupó dentro del genotipo I, relacionándose genéticamente con la cepa de Referencia Hawaii/1943, lo cual difería de otros aislamientos del Caribe, obtenidos entre 1977 y principios de los años 80 (110).

Para precisar el origen exacto de los 5 aislamientos de VDEN-1 del período 2020-2022, será necesario secuenciar un número mayor de muestras de dicho período.

Tabla 6. Cambios en la proteína de la envoltura (E) de las cepas de VDEN-1 en estudio.

| Cambio aminoácido (posición) | Aislamientos VDEN-1 | | | | |
|------------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 219/20 | 872/20 | 888/20 | 520/21 | 636/22 |
| S→N (863) | + | + | + | + | + |
| D→N (949) | + | + | + | + | + |
| I→L (1180) | + | + | + | + | + |
| S→T (1304) | + | + | + | + | + |
| T→I (1322) | + | + | + | - | - |
| N→D (1420) | + | - | + | + | + |
| M→T (1730) | - | + | - | - | - |
| I→V (1810) | + | + | + | + | + |
| A→T (1945) | + | + | + | + | + |
| I→V (1978) | + | + | + | + | + |
| R→K (2021) | + | + | + | + | + |
| I→V (2155) | + | + | + | + | + |
| I→V (2209) | + | + | + | + | + |
| V→I (2221) | + | + | + | + | + |
| L→M (2290) | + | + | + | + | + |

+: Presentan la mutación -: No presentan la mutación

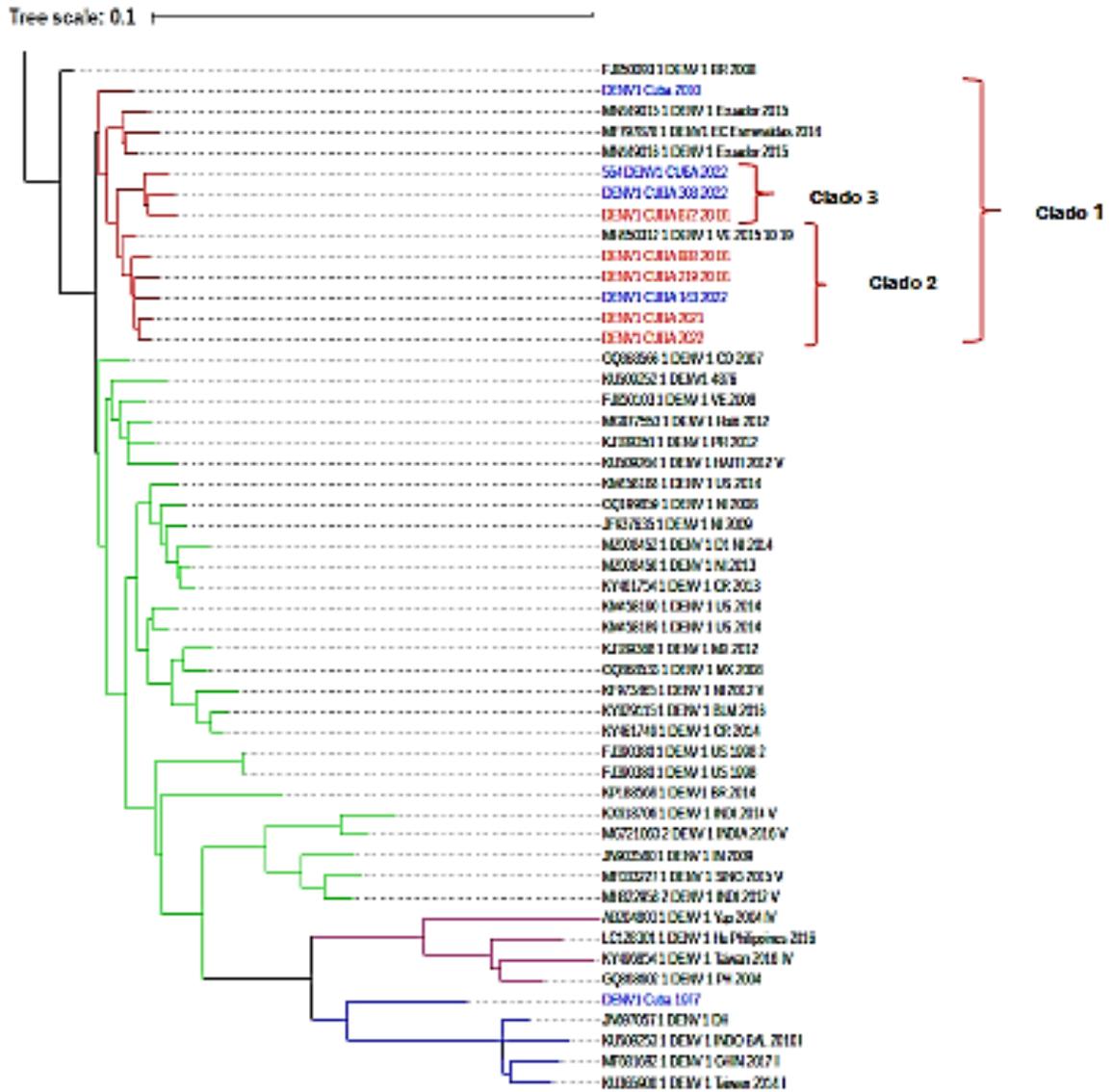


Figura 3. Árbol filogenético que muestra secuencias de DENV-1 de Cuba de años anteriores y secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank, alineadas con secuencias de DENV-1 de 5 aislamientos de DENV-1 correspondientes a los años 2020, 2021 y 2022. En el árbol se muestra en color azul secuencias de genotipo I, en color fucsia secuencias del genotipo IV y la ramas de color verde representan el genotipo V de DENV-1, dentro de estas últimas se encuentran señaladas de color rojo las secuencias cubanas analizadas en este trabajo.

V. ANÁLISIS Y DICUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación resumimos en una tabla las características biológicas y moleculares de las 5 cepas VDEN-1 (Tabla 7) .

Tabla 7. Resumen de las características biológicas y moleculares de los aislamientos VDEN-1.

| Aislamiento VDEN-1 | Clasificación clínica | ECP (7mo día) | Título viral (UFP/ml) | Tamaño de las placas | % mortalidad ratones lactantes | Cambios aminoácidos | Genotipo | Clado |
|--------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------|--|----------|-------|
| 219/20 | DSSA | XXX | 1.4×10^3 | Grandes | 100 | | V | 2 |
| 872/20 | DSSA | X | 7.3×10^2 | Grandes | 90 | (+) M→T (1730) (-) N→D (1420) | V | 3 |
| 888/20 | DCSA | X | 1.7×10^4 | Grandes | 100 | | V | 2 |
| 520/21 | DSSA | X | 2.4×10^3 | Pequeñas | 58 | (-) T→I (1322) | V | 2 |
| 636/22 | DCSA | XXX | 1.4×10^4 | Pequeñas | 67 | (-) T→I (1322) | V | 2 |

Leyenda: (+): Presentan la mutación

(-): No presentan la mutación

DSSA: Dengue sin signos de alarma

DCSA: Dengue con signos de alarma

Como observamos en ella existe un patrón heterogéneo entre estas cepas del mismo serotipo. Parte de las características evaluadas sugieren que las cepas 219/20 y 636/22 muestran un patrón diferente en su multiplicación en las líneas celulares evaluadas y en su mortalidad mayor del 50% en ratones lactantes. Sin

embargo las características moleculares evaluadas en la secuenciación de la proteína E no lo avalan así.

Los resultados de este estudio apuntan a la presencia de virus con diferentes características lo cual sugiere la posibilidad de que un virus experimente cambios durante la evolución de una epidemia, estos cambios pueden estar condicionados tanto por la introducción de nuevas variantes así como modificaciones ya que VDEN puede experimentar mecanismos de variabilidad genética como mutaciones y recombinaciones durante el transcurso de la transmisión. Un hallazgo similar fue reportado por Rodríguez y colaboradores, tras el estudio de diferentes cepas de VDEN-2 (epidemia 1997) y de VDEN-3 (epidemia 2001-2002) al demostrar cambios aminoacídicos en las proteínas no estructurales del virus para VDEN-2 y en las estructurales y no estructurales para VDEN-3 (99,100).

Las diferencias en las propiedades biológicas pueden ser explicadas por la introducción de nuevas variantes de VDEN-1 o por mecanismos de variabilidad genética. Todas las cepas de estudio provienen de pacientes sintomáticos leves, por lo que sería necesario llevar a cabo el aislamiento de VDEN de muestras de pacientes sintomáticos graves que hayan desarrollado patologías asociadas a infección por VDEN (hepatopatías, miocarditis, encefalopatía) para apoyados por estudios de secuenciación nucleotídica y la evaluación de otras propiedades biológicas, definir si realmente el virus experimenta cambios con la progresión de la epidemia y determinar si esta variabilidad es condicionada por cambios genéticos. Por tanto, será necesario realizar la secuenciación completa de estos 5 aislamientos para explicar las divergencias encontradas en algunas de las propiedades biológicas.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- Los 5 aislamientos de VDENV-1 manifestaron un comportamiento similar en las líneas celulares C6/36-HT y AP-61, mostrando la cepa 636/22 el ECP de mayor intensidad y un título viral superior.
- Se observaron dos patrones en relación al tamaño de placas y las cepas más neurovirulentas fueron la 219/20 y la 888/20 que podrían sugerir cambios biológicos entre ellas.
- Todas las cepas se agruparon en el genotipo V, en clados diferentes junto a cepas de Cuba de años anteriores y las diferencias aminoacídicas encontradas entre ellas no explican las diferencias encontradas en la caracterización biológica de las mismas.
- Existe una variabilidad en el comportamiento de las cepas de VDENV-1, aisladas en el período estudiado, sugiriendo la posibilidad de que un virus experimente cambios durante la evolución de la transmisión ya sea por la introducción de nuevas variantes o por el desarrollo de mecanismos de variabilidad genética.

VII. RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el aislamiento de otras cepas de VDEN-1 a partir de muestras de individuos sintomáticos y asintomáticos y a partir de muestras colectadas en diferente período de la transmisión.
- Evaluar otras características biológicas de las cepas como la sensibilidad a la temperatura y la cinética de multiplicación viral en líneas celulares de mamíferos y mosquitos.
- Evaluar otros modelos animales que permitan demostrar el papel de los cambios encontrados.
- Realizar la secuencia nucleotídica completa de las cepas de VDEN-1 aisladas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Enfermedades transmitidas por vectores [Internet]. 2020. [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
2. OPS/OMS. Dengue [Internet]. 2020 [citado 14 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/dengue>
3. Casartelli Vall D, Godoy Sánchez L, Mesquita Ramírez M, Casartelli Vall D, Godoy Sánchez L, Mesquita Ramírez M. Características de la Fiebre Dengue en niños menores de 6 meses, un estudio retrospectivo. 2023 [citado 15 de noviembre de 2023];50(1):20-6. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1683-98032023000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=es
4. Bacallao GC, Quintana O. Dengue [Internet] [Revisión Bibliográfica]. [Villa Clara]: Hospital Provincial Universitario “Arnaldo Milián Castro”; 2013 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicadelcentro/mec-2013/mec131r.pdf>
5. OMS. Dengue y dengue grave [Internet]. 2023 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
6. OMS. Expansión geográfica de los casos de dengue y chikungunya más allá de las áreas históricas de transmisión en la Región de las Américas [Internet]. 2023 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/2023-DON448>
7. OMS. Dengue – Región de las Américas [Internet]. 2023 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/2023-DON475>

8. Díaz G, Rodríguez-Roche R, Guzmán MG. Relación genética del virus dengue 1 aislado en Cuba durante la epidemia de 1977. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. 25 de mayo de 2016 [citado 15 de septiembre de 2023];68(1). Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/124>
9. Guzmán M, Vázquez S, Alvarez M, Pelegrino JL, Ruiz D, Martinez P, et al. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017*. *Revista cubana de medicina tropical* [Internet]. 1 de abril de 2019 [citado 25 de abril de 2023];71(1). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/343574548_Vigilancia_de_laboratorio_de_dengue_y_otros_arbovirus_en_Cuba_1970-2017
10. Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1989 [citado 25 de abril de 2023];67(4):375-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2805215/>
11. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1998 [citado 25 de abril de 2023];4(1):89-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9454563/>
12. Peláez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* [Internet]. abril de 2004 [citado 25 de abril de 2023];10(4):719-22. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/4/03-0271_article
13. Beltrán YL, García FJS, Torres EM. Dengue en el primer año de la vida. *Revista Cubana de Pediatría* [Internet]. 28 de junio de 2021 [citado 15 de septiembre de 2023];93(3). Disponible en: <https://revpediatria.sld.cu/index.php/ped/article/view/1334>

14. MINSAP. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas [Internet]. OPS; 2006 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/brote-dengue-cuba-2006-vol-3-no-1-24-octubre-2006>
15. PLISA. Dengue Serotipos [Internet]. 2023 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/549-dengue-serotypes-es.html>
16. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. Journal of General Virology [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 15 de septiembre de 2023];98(1):2-3. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000672>
17. BMJ Best Practice. Dengue - Síntomas, diagnóstico y tratamiento [Internet]. [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://bestpractice.bmj.com/topics/es-es/1197>
18. ICTV. Current ICTV Taxonomy Release [Internet]. 2022 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://ictv.global/taxonomy>
19. Driggs YC, Aguilar Penas LM, Batista Pupo FJ, Driggs YC, Aguilar Penas LM, Batista Pupo FJ. Importancia de la prevención del dengue. Revista Cubana de Medicina [Internet]. septiembre de 2021 [citado 14 de septiembre de 2023];60(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75232021000300018&lng=es&nrm=iso&tIng=es
20. Comisión Directiva de la Sociedad Argentina de Virología. Breve actualización sobre Dengue 2023 [Internet]. 2023 [citado 15 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://panel.aam.org.ar/img_up/03052023.1.pdf

21. Cáceres Munar BA, Castellanos Parra JE, Rodríguez Panduro MH. Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. *Acta Biolo Colomb* [Internet]. 2019;24(3):439-51. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v24n3/0120-548X-abc-24-03-439.pdf>
22. ICTV. Genus: Orthoflavivirus [Internet]. 2023 [citado 18 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>
23. López ED, Alatorre AFAG. Dengue: news and epidemiological characteristics in Mexico. *Rev Med UAS* [Internet]. 6 de diciembre de 2022 [citado 18 de septiembre de 2023];9(3):159-70. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=108582>
24. García LS, Roviralta LC, Parra WC, Pupo RCM. Comportamiento de los componentes del sistema inmune durante la enfermedad del dengue. *Correo Científico Médico* [Internet]. 13 de octubre de 2022 [citado 18 de septiembre de 2023];26(3). Disponible en: <https://revcocmed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/4146>
25. Velandia M, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio* [Internet]. 2011 [citado 15 de noviembre de 2023];15(1). Disponible en: https://revistainfectio.org/P_OJS/index.php/infectio/article/view/6
26. Pan P, Zhang Q, Liu W, Wang W, Lao Z, Zhang W, et al. Dengue Virus M Protein Promotes NLRP3 Inflammasome Activation To Induce Vascular Leakage in Mice. *J Virol* [Internet]. 15 de octubre de 2019 [citado 18 de septiembre de 2023];93(21):e00996-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6803285/>
27. Contreras M, Rincón MA, Vazquez A, Moreira R, Callejas D. Aspectos genéticos del virus del dengue. *Revista de Ciencias de la Salud Universidad*

- Técnica de Manabí [Internet]. agosto de 2021 [citado 15 de septiembre de 2023];5(2):79-88. Disponible en: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/QhaliKay>
28. Héctor Sebastián Cervera, Sandy Katherine Cristancho. Proteína NS1: un blanco terapéutico para infecciones por dengue y zika [Internet]. [Bogotá]: Universidad El Bosque; 2020 [citado 18 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/6389/Cervera_Osorio_Hector_Sebastian_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y
29. Diosa-Toro M, Prasanth KR, Bradrick SS, Garcia Blanco MA. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virology* [Internet]. 25 de abril de 2020 [citado 18 de septiembre de 2023];17(1):60. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>
30. Nie Y, Deng D, Mou L, Long Q, Chen J, Wu J. Dengue Virus 2 NS2B Targets MAVS and IKK ϵ to Evade the Antiviral Innate Immune Response. *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 28 de mayo de 2023 [citado 18 de septiembre de 2023];33(5):600-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10236164/>
31. Adler NS, Cababie LA, Sarto C, Cavasotto CN, Gebhard LG, Estrin DA, et al. Insights into the product release mechanism of dengue virus NS3 helicase. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 7 de julio de 2022 [citado 18 de septiembre de 2023];50(12):6968. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9262617/>
32. Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. En: *Fields Virology*. 6ta ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-46.
33. Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses* [Internet]. diciembre de 2019 [citado 18 de

- septiembre de 2023];11(12):1136. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/12/1136>
34. García EH. Epidemiología y evolución molecular del virus del dengue en Veracruz, México [Internet] [Ph.D. Thesis]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2022 [citado 18 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/4223/SSIT0019238.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 35. Li Q, Kang C. Dengue virus NS4B protein as a target for developing antivirals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2022 [citado 18 de septiembre de 2023];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.959727>
 36. Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio* [Internet]. 12 de mayo de 2015 [citado 4 de septiembre de 2023];6(3):e00553-00515. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00553-15>
 37. Murugesan A, Manoharan M. Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* [Internet]. 2020 [citado 18 de septiembre de 2023];281-359. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149978/>
 38. Giraldo MI, Xia H, Aguilera-Aguirre L, Hage A, van Tol S, Shan C, et al. Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature* [Internet]. septiembre de 2020 [citado 15 de noviembre de 2023];585(7825):414-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2457-8>
 39. Izaguirre G. The Proteolytic Regulation of Virus Cell Entry by Furin and Other Proprotein Convertases. *Viruses* [Internet]. 9 de septiembre de 2019 [citado

- 18 de septiembre de 2023];11(9):837. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6784293/>
40. Castillo-Macías A, Salinas-Carmona MC, Torres-López E. Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika. *Medicina Universitaria* [Internet]. 1 de octubre de 2017 [citado 18 de septiembre de 2023];19(77):198-207. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665579617301023>
41. Heinz FX, Stiasny K. Proteolytic Activation of Flavivirus Envelope Proteins. En: Böttcher-Friebertshäuser E, Garten W, Klenk HD, editores. *Activation of Viruses by Host Proteases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 18 de septiembre de 2023]. p. 109-32. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75474-1_6
42. Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J, Smit J. Dengue Virus Life Cycle: Viral and Host Factors Modulating Infectivity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [Internet]. 1 de abril de 2010 [citado 18 de septiembre de 2023];67:2773-86. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-010-0357-z>
43. Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. *Curr Opin Virol* [Internet]. diciembre de 2014 [citado 18 de septiembre de 2023];0:134-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4268268/>
44. Watterson D, Modhiran N, Young PR. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Research* [Internet]. 1 de junio de 2016 [citado 19 de septiembre de 2023];130:7-18. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354216301164>
45. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal* [Internet]. 29 de julio de 2016 [citado 19 de

- septiembre de 2023];13(1):131. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
46. Liang PC, Chen KY, Huang CH, Chang K, Lu PL, Yeh ML, et al. Viral Interference Between Dengue Virus and Hepatitis C Virus Infections. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 3 de julio de 2020 [citado 19 de septiembre de 2023];7(8):ofaa272. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7452371/>
47. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res* [Internet]. octubre de 2016 [citado 18 de septiembre de 2023];134:244-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166354216303795?via%3Dihub>
48. Damonte E. Dengue: Un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. *Química Viva* [Internet]. 1 de enero de 2006 [citado 18 de septiembre de 2023]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26506088_Dengue_Un_viejo_y_nuevo_desafio_para_la_quimioterapia_antiviral
49. Escobar OET, Olivera TMG, Yendez NVE, Rubio DG, Peraza OC. La reemergencia del dengue: un gran desafío para el sistema sanitario latinoamericano y caribeño en pleno siglo XXI. *MEDISAN* [Internet]. 12 de abril de 2019 [citado 19 de septiembre de 2023];23(2). Disponible en: <https://medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/2637>
50. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* [Internet]. enero de 2015 [citado 19 de septiembre de 2023];71(1):67-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4297835/>

51. Zomosa-Signoret VC, Morales-González KR, Estrada-Rodríguez AE, Rivas-Estilla AM, Devèze-García MC, Galaviz-Aguilar E, et al. Alanine Substitution Inactivates Cross-Reacting Epitopes in Dengue Virus Recombinant Envelope Proteins. *Viruses* [Internet]. febrero de 2020 [citado 15 de noviembre de 2023];12(2):208. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/208>
52. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses* [Internet]. agosto de 2020 [citado 15 de noviembre de 2023];12(8):829. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/829>
53. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol* [Internet]. 1 de enero de 2021 [citado 15 de noviembre de 2023];78(1):17-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>
54. MSF. Dengue [Internet]. Guías de práctica clínica MSF. [citado 21 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://medicalguidelines.msf.org/es/viewport/CG/spanish/dengue-23443301.html>
55. Policlínico Docente “Ángel Machaco Ameijeiras”. Dengue [Internet]. [citado 14 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/polmachaco/dengue/>
56. Quirino-Teixeira AC, Rozini SV, Barbosa-Lima G, Coelho DR, Carneiro PH, Mohana-Borges R, et al. Inflammatory signaling in dengue-infected platelets requires translation and secretion of nonstructural protein 1. *Blood Adv* [Internet]. 11 de mayo de 2020 [citado 21 de septiembre de 2023];4(9):2018-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7218431/>
57. Imad HA, Phumratanaprapin W, Phonrat B, Chotivanich K, Charunwatthana P, Muangnoicharoen S, et al. Cytokine Expression in Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients with Bleeding and Severe Hepatitis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. mayo de 2020 [citado 21 de septiembre de

- 2023];102(5):943-50. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7204576/>
58. Begum F, Das S, Mukherjee D, Ray U. Hijacking the Host Immune Cells by Dengue Virus: Molecular Interplay of Receptors and Dengue Virus Envelope. *Microorganisms* [Internet]. 6 de septiembre de 2019 [citado 21 de septiembre de 2023];7(9):323. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6780243/>
59. Álvarez Vera M, Díaz Morejón D, Rodríguez Roche R, Morier Diaz L, Guzmán Tirado MG. Títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de individuos posconvalescientes con dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. marzo de 2014 [citado 21 de septiembre de 2023];66(1):132-42. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602014000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
60. Khanam A, Gutiérrez-Barbosa H, Lyke KE, Chua JV. Immune-Mediated Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viruses* [Internet]. 21 de noviembre de 2022 [citado 21 de septiembre de 2023];14(11):2575. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9699586/>
61. Kraivong R, Punyadee N, Liszewski MK, Atkinson JP, Avirutnan P. Dengue and the Lectin Pathway of the Complement System. *Viruses* [Internet]. 24 de junio de 2021 [citado 21 de septiembre de 2023];13(7):1219. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8310334/>
62. Ali MG, Zhang Z, Gao Q, Pan M, Rowan EG, Zhang J. Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol Res* [Internet]. 2020 [citado 21 de septiembre de 2023];68(6):325-39. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7648849/>
63. Castilho BM, Silva MT, Freitas ARR, Fulone I, Lopes LC. Factors associated with thrombocytopenia in patients with dengue fever: a retrospective cohort

- study. *BMJ Open* [Internet]. 13 de septiembre de 2020 [citado 21 de septiembre de 2023];10(9):e035120. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7488788/>
64. Chao CH, Wu WC, Lai YC, Tsai PJ, Perng GC, Lin YS, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLOS Pathogens* [Internet]. 22 de abril de 2019 [citado 21 de septiembre de 2023];15(4):e1007625. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007625>
65. Leowattana W, Leowattana T. Dengue hemorrhagic fever and the liver. *World J Hepatol* [Internet]. 27 de diciembre de 2021 [citado 21 de septiembre de 2023];13(12):1968-76. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8727196/>
66. Malik S, Ahsan O, Mumtaz H, Tahir Khan M, Sah R, Waheed Y. Tracing down the Updates on Dengue Virus—Molecular Biology, Antivirals, and Vaccine Strategies. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 5 de agosto de 2023 [citado 21 de septiembre de 2023];11(8):1328. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10458802/>
67. OPS. Algoritmos para el Manejo Clínico de los Casos de Dengue. Programa Regional de Enfermedades Arbovirales [Internet]. 2020 [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/algoritmos-para-manejo-clinico-casos-dengue>
68. Sirisena PDNN, Mahilkar S, Sharma C, Jain J, Sunil S. Concurrent dengue infections: Epidemiology & clinical implications. *Indian Journal of Medical Research* [Internet]. noviembre de 2021 [citado 28 de septiembre de 2023];154(5):669. Disponible en:

https://journals.lww.com/ijmr/fulltext/2021/11000/concurrent_dengue_infections_epidemiology__5.aspx

69. Wellekens K, Betraíns A, De Munter P, Peetermans W. Dengue: current state one year before WHO 2010–2020 goals. *Acta Clinica Belgica* [Internet]. 4 de marzo de 2022 [citado 28 de septiembre de 2023];77(2):436-44. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17843286.2020.1837576>
70. Reyes DV, Clausell AB, Díaz AM. Diagnóstico diferencial entre dengue y COVID-19. *Revista 16 de abril* [Internet]. 5 de enero de 2023 [citado 28 de septiembre de 2023];62(0):1608. Disponible en: https://rev16deabril.sld.cu/index.php/16_04/article/view/1608
71. CDC. Guía para la realización de pruebas Dengue [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/testing/testing-guidance.html>
72. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue [Internet]. 2013 [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi_0ZG42MaCAxUNszABHZGJA_MQFnoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fes%2Ffile%2F27781%2Fdownload%3Ftoken%3D1ZDpy3WD&usg=AOvVaw1gPrSEJsmXtrGV4DUFwywQ&opi=89978449
73. Guzmán MG, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. diciembre de 2002 [citado 28 de septiembre de 2023];54(3):180-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602002000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
74. Sudeep AB, Parashar D, Jadi RS, Basu A, Mokashi C, Arankalle VA, et al. Establishment and Characterization of a New *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:

- Culicidae) Cell Line with Special Emphasis on Virus Susceptibility. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* [Internet]. 2009 [citado 28 de septiembre de 2023];45(9):491-5. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/20616584>
75. WHO. Dengue guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control: nueva edición. 2009;(WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1). Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/44504>
76. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. diciembre de 2010 [citado 2 de noviembre de 2023];8(12 Suppl):S30-38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21548185/>
77. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* [Internet]. enero de 2002 [citado 2 de noviembre de 2023];2(1):33-42. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(01\)00171-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(01)00171-2/fulltext)
78. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. julio de 1998 [citado 28 de septiembre de 2023];11(3):480-96. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.11.3.480>
79. Suvarna JC, Rane PP. Serum lipid profile: a predictor of clinical outcome in dengue infection. *Trop Med Int Health* [Internet]. mayo de 2009 [citado 28 de septiembre de 2023];14(5):576-85. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3156.2009.02261.x>
80. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. noviembre de 2009 [citado 28 de septiembre de 2023];81(5):825-33. Disponible en: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/81/5/article-p825.xml>

81. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol* [Internet]. junio de 2008 [citado 28 de septiembre de 2023];21(2):123-32. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2008.0007>
82. Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, Kaiser M, Rumer L, Jarman RG, et al. 2nd International External Quality Control Assessment for the Molecular Diagnosis of Dengue Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 5 de octubre de 2010 [citado 16 de octubre de 2023];4(10):e833. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000833>
83. Usme-Ciro JA, Gómez-Castañeda AM, Gallego-Gómez JC. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. *Salud Uninorte* [Internet]. 2012 [citado 15 de noviembre de 2023];28(1):1-15. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81724108002>
84. Rodríguez Pérez C, Carreño Ruiz SD, Martínez Rodríguez M, Ortíz Ojeda RF. PCR como técnica molecular más utilizada en el diagnóstico del virus del dengue. Revisión sistemática. *LATAM* [Internet]. 16 de marzo de 2023 [citado 28 de septiembre de 2023];4(1):3444-55. Disponible en: <https://latam.redilat.org/index.php/lt/article/view/498>
85. Grobusch MP, Niedrig M, Göbels K, Klipstein-Grobusch K, Teichmann D. Evaluation of the use of RT-PCR for the early diagnosis of dengue fever. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. abril de 2006 [citado 16 de octubre de 2023];12(4):395-7. Disponible en: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61610-4/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61610-4/fulltext)
86. CDC. Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC [Internet]. 2023 [citado 16 de octubre de 2023]. Disponible en:

<https://www.paho.org/en/documents/cdc-denv-1-4-real-time-rt-pcr-assay-detection-and-serotype-identification-dengue-virus>

87. Álvarez-Díaz DA, Valencia-Álvarez E, Rivera JA, Rengifo AC, Usme-Ciro JA, Peláez-Carvajal D, et al. An updated RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantification of chikungunya, dengue and zika viruses. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 16 de octubre de 2023];93:104967. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134821002641>

88. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* [Internet]. abril de 2006 [citado 15 de octubre de 2023];44(4):1295-304. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16597854/>

89. Songjaeng A, Thiemmecca S, Mairiang D, Punyadee N, Kongmanas K, Hansuealueang P, et al. Development of a Singleplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Pan-Dengue Virus Detection and Quantification. *Viruses* [Internet]. 10 de junio de 2022 [citado 16 de octubre de 2023];14(6):1271. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9231192/>

90. Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J* [Internet]. 23 de enero de 2009 [citado 15 de octubre de 2023];6:10. Disponible en: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-6-10>

91. Batovska J, Lynch SE, Rodoni BC, Sawbridge TI, Cogan NO. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *J Virol Methods* [Internet]. noviembre de 2017 [citado 15 de octubre de 2023];249:79-84. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093417303889?via%3Dihub>

92. WMA. Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. [citado 2 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
93. Parlamento Europeo, Consejo de la Unión Europea. DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos [Internet]. 2010 p. 47. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf>
94. CECMED. REGULACIÓN No. 64/13 LINEAMIENTOS PARA LA CONSTITUCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LOS COMITÉS INSTITUCIONALES PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL). [citado 2 de octubre de 2023]; Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_no_64_2013_lineamientos_cicual-1.pdf
95. Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliott H, Francis RJ, Hubrecht RC, et al. Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, biomédicos y legales. 2005 [citado 2 de octubre de 2023]; Disponible en: <https://cai.ucm.es/data/cai/2/Punto-Final-humanitario-139.pdf>
96. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Epidemiology [Internet]. 1 de mayo de 1938 [citado 2 de octubre de 2023];27(3):493-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>

97. Santiago GA, González GL, Cruz-López F, Muñoz-Jordan JL. Development of a Standardized Sanger-Based Method for Partial Sequencing and Genotyping of Dengue Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 28 de marzo de 2019 [citado 11 de octubre de 2023];57(4):10.1128/jcm.01957-18. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01957-18>
98. Franco L, Gegúndez MI, Navarro JM, Negro AI, De Ory F, Sánchez-Seco MP, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes [Internet]. España; 2013 [citado 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia47.pdf>
99. Rodríguez-Roche R, López Matilla L, Alvarez Vera M, Morier Díaz L, Guzmán Tirado MG. Propiedades biológicas de cepas de virus dengue serotipo 2 aisladas durante la epidemia en Santiago de Cuba, 1997. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. diciembre de 2011 [citado 26 de octubre de 2023];63(3):211-2190. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602011000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
100. Rodríguez-Roche R, López Matilla L, Álvarez Vera M, Morier Díaz L, Guzmán Tirado MG. Propiedades biológicas de cepas de dengue virus-3 aisladas durante la epidemia ocurrida en La Habana, 2001-2002. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. agosto de 2012 [citado 26 de octubre de 2023];64(2):187-98. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602012000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
101. Camacho García DE, Bracho-Labadie M, Rodríguez Henríquez F, Morier Díaz L, Guzmán Tirado MG, Comach Pérez GA. Propiedades biológicas de cepas venezolanas de DENV-2 aisladas de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica del dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet].

- diciembre de 2009 [citado 31 de octubre de 2023];61(3):259-68. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602009000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
102. Vogt MB, Lahon A, Arya RP, Spencer Clinton JL, Rico-Hesse R. Dengue viruses infect human megakaryocytes, with probable clinical consequences. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 25 de noviembre de 2019 [citado 31 de octubre de 2023];13(11):e0007837. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6901235/>
103. Villalobos-Sánchez E, Rico-Fuentes C, Mateos-Díaz JC, Elizondo-Quiroga D. Estudio de la atenuación del virus dengue serotipo 2 en cultivos de células vero CCL-81 y C6/36. *CIATEJ* [Internet]. 2015 [citado 30 de octubre de 2023]; Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/154/1/cartel%20endi%20final.pdf>
104. Zou C, Huang C, Zhang J, Wu Q, Ni X, Sun J, et al. Virulence difference of five type I dengue viruses and the intrinsic molecular mechanism. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 4 de marzo de 2019 [citado 31 de octubre de 2023];13(3):e0007202. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6417740/>
105. Cantelar de Francisco N, Fernández A, Albert Molina L, Pérez Balbis E. Survey of dengue in Cuba. 1978-1979. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. abril de 1981 [citado 31 de octubre de 2023];33(1):72-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7034065/>
106. Lizarazo E, Couto N, Vincenti-Gonzalez M, Raangs EC, Velasco Z, Bethencourt S, et al. Applied shotgun metagenomics approach for the genetic characterization of dengue viruses. *J Biotechnol* [Internet]. 2019 [citado 31 de octubre de 2023];306S:100009. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590155919300058?via%3Dihub>

107. Ramos-Castañeda J, Barreto dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 9 de enero de 2017 [citado 31 de octubre de 2023];11(1):e0005224. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5221820/>
108. Avilés G, Meissner J, Mantovani R, St. Jeor S. Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina. *Virus Research* [Internet]. 1 de diciembre de 2003 [citado 31 de octubre de 2023];98(1):75-82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170203002569>
109. Souza U, Macedo Y, Santos R, Cardoso F, Galvão J, Gabev E, et al. Circulation of Dengue Virus Serotype 1 genotype V and Dengue Virus Serotype 2 genotype III in Tocantins State, Northern Brazil, 2021-2022 [Internet]. 2023 [citado 31 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/374191685_Circulation_of_Dengue_Virus_Serotype_1_genotype_V_and_Dengue_Virus_Serotype_2_genotype_III_in_Tocantins_State_Northern_Brazil_2021-2022
110. Goncalvez Ap, Escalante Aa, Pujol Fh, Ludert Je, Tovar D, Salas Ra, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* [Internet]. 11 de octubre de 2002 [citado 15 de noviembre de 2023];303(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12482662/>

ANEXOS

Anexo1. Aval de Comisión Científica Especializada de Microbiología.

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURI (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), ha aprobado la propuesta de Protocolo como trabajo de terminación de la residencia en Microbiología Médica: **Caracterización biológica de los aislamientos de virus dengue 1 en Cuba, 2020** de la autora Dra. Gladys Solanch Borrero Estrada, tutelado por Prof. Mayling Álvarez Vera, Dr. C, Prof. Luis Morier Díaz, M. Sc y Prof. María Guadalupe Guzmán Tirado, Dr. Cs. El mismo forma parte de las tareas del proyecto Dengue en Cuba 2017-2021, aprobado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética de la Investigación del IPK (CEI-IPK 01-20).

Dra. María Teresa Ilbnait Zaragoza, Dr C
Presidente CCEM, IPK

La Habana, 20 de agosto, 2022

Anexo 2. Aval del Comité de Ética de la Investigación

COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURI"

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 46-22

**"Caracterización biológica de los aislamientos de virus dengue 1 en Cuba,
2020"**

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dra. Gladys Solanch Borrero Estrada

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. **APROBADO**, el documento presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 22 días del mes de febrero de 2023

DrC. Daniel González Rubio
Vicepresidente CEI-IPK

Anexo 3. Cebadores para RCP-TR

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|--------------------------------|
| DENV-1 PCR-F | AGC ACA TGC YAT AGG AAC ATC C |
| DENV-1 PCR-R | GCT GAT CGA ATT CCA CAC ACR CC |

Anexo 4. Cebadores para la secuenciación de VDEN-1

| Serotipo | Oligonucleótido | Secuencia |
|----------|-----------------|---------------------------------|
| VDEN-1 | D1SEQ1 | GCY ATA GGA ACA TCC ATC ACY CAG |
| | D1SEQ2 | ACG TGT GCY AAG TTY AAG TGT GT |
| | D1SEQ3 | AAG ACA GCT CAT GCA AAG AAR CAG |
| | D1SEQ4 | TTG GTG AGA GYT ACA TCG TGR TAG |
| | D1SEQ5 | GCT GAT CGA ATT CCA CAC ACR C |
| | D1SEQ6 | CTG GTG TAC CAA TTT TCC CAC AG |
| | D1SEQ7 | TGG GTC TCA GCC ACT TCC TTC T |
| | D1SEQ8 | AGC CCT GTT CTA GGT GAG CAA TC |