

Actualización en diagnóstico del dengue: evolución de las técnicas y su aplicación real en la clínica

*Update on dengue diagnosis:
techniques evolution and their clinical application*

Laura Gutiérrez Ruiz¹, Diana Carolina Quintero Gil², Marlén Martínez Gutiérrez³

Resumen: el dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores de mayor importancia en el mundo. Debido a que hasta el momento no existe una vacuna licenciada para la prevención de la infección ni una terapia específica para controlar la enfermedad, el diagnóstico temprano y específico resulta ser una herramienta de vital importancia para brindar un tratamiento rápido y oportuno al paciente. Aunque hace más de seis décadas se dispone de una variedad de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de esta enfermedad, es frecuente encontrar que no existe un consenso en el personal o en las entidades colombianas encargadas del diagnóstico de laboratorio sobre las ventajas y las limitaciones de estas técnicas, lo que dificulta dicho diagnóstico. Adicionalmente, debido a que la mayoría de técnicas que se usan se basan en la respuesta inmune frente al virus, y se pueden presentar reacciones cruzadas con otros virus genéticamente relacionados, la posibilidad de falsos positivos es alta. Principalmente, por esta razón, en los últimos años ha aumentado el desarrollo y la validación de técnicas moleculares, ya que son más sensibles, específicas y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se hace necesario comparar a la luz de la literatura disponible la utilidad real de las técnicas de laboratorio existentes, clasificándolas en celulares, inmunológicas y moleculares.

Palabras clave: virus dengue, dengue, pruebas inmunológicas, técnicas de diagnóstico molecular, diagnóstico precoz.

Abstract: dengue is the vector-borne viral disease of major importance in the world. Because so far there is no licensed vaccine that can be used to prevent the infection and there is no specific antiviral treatment, the early and specific diagnosis is a powerful tool to provide prompt and timely management of the patient. Despite during more than six decades there has been available a wide variety of laboratory techniques that can be used for the diagnosis of dengue, there is often lack of a consensus among the people or entities responsible of the diagnosis about the advantages and disadvantages of these techniques; for this reason, the diagnosis of dengue is more difficult. Moreover, taking into account that most of the techniques used are based on the immune response against dengue virus, and a cross reactivity with other viruses genetically related could be possible; the possibility of false positives is high. Accordingly, in recent years the development and validation of molecular techniques has increased, as they are more sensitive, specific and

¹ Estudiante de Microbiología y Bioanálisis. Escuela de Microbiología. Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Bióloga. MSc en Biología. Investigador Asociado. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Bacterióloga y Laboratorista Clínica. MSc en Microbiología. PhD en Ciencias Básicas Biomédicas-Virología. Docente-Investigador. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correspondencia: Sede de Investigación Universitaria, Calle 62 #52-59 Laboratorio 632. E-mail: mmartinezg@udea.edu.co

Conflicto de intereses: las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2012; 18: 411-441

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 94. Editora Médica Colombiana S.A., 2012®.

Recibido el 30 de agosto de 2012; aceptado el 9 de octubre de 2012.

rapid than the cellular and immunological techniques. Therefore, it is necessary to compare the usefulness of laboratory techniques to dengue diagnosis, such as cellular, immunological and molecular tests.

Key words: dengue virus, dengue, immunologic techniques, molecular diagnostic techniques, early diagnosis.

De las enfermedades transmitidas por artrópodos, aquellas causadas por el virus dengue se consideran las más importantes en cuanto a morbilidad y a mortalidad. Existen cuatro serotipos de este virus, DENV-1 a DENV-4, todos capaces de producir varios tipos de enfermedad en el humano, conocidos comúnmente como “dengue”. Este término incluye tanto las formas no aparentes o silentes de la enfermedad como las formas clínicas severas y no severas [1].

Más de 2,5 billones de personas habitan en zonas endémicas para el virus dengue y se estima que anualmente se presentan entre 50 y 100 millones de casos de dengue en todo el mundo [2]. Entre los factores responsables de la emergencia y la reemergencia del virus se encuentran el crecimiento de la población y la circulación constante de varios serotipos en las mismas áreas endémicas, así como la gran densidad y la distribución geográfica de los vectores [3]. Estos factores, sumados a la alta morbitmortalidad de la infección, hacen que la enfermedad no solo sea un serio problema de salud pública, sino también un problema social y económico en los países en vía de desarrollo [4].

Debido a que hasta el momento no existe una vacuna licenciada para la prevención de la infección ni una terapia específica para controlar la enfermedad [5], el diagnóstico temprano y específico es de vital importancia para brindar un tratamiento rápido y oportuno al paciente. El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa en las manifestaciones clínicas, pero el diagnóstico confirmatorio se debe hacer con base en pruebas de laboratorio, ya sean celulares (aislamiento de virus en cultivos) o inmunológicas (detección de IgM en fase aguda o sero-conversión en fase convaleciente) [6]. Adicionalmente, los avances en técnicas de biología molecular han abierto la posibilidad de un diagnóstico más rápido y específico que podría ayudar a mejorar el tratamiento de los pacientes y por consiguiente, a controlar el desarrollo de la enfermedad [7]. En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una agenda de prioridades en investigación de dengue [8], en la que se recomienda, entre otras cosas, validar las nuevas técnicas de diagnóstico descritas recientemente, haciendo especial énfasis en las moleculares [9], ya que son más sensibles y rápidas que las técnicas celulares e inmunológicas; además, son una herramienta epidemiológica importante para detectar el serotipo viral, y mediante secuenciación de regiones específicas en el genoma permiten identificar las cepas circulantes, lo que las convierte en una herramienta útil en estudios de evolución viral [10].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es necesaria una revisión de literatura en relación con las técnicas que históricamente se han empleado para el diagnóstico de dengue, con el fin de facilitarle al médico o al personal de laboratorio la elección de un método diagnóstico en aquellos casos en donde hay sospecha de dengue.

El dengue como un problema de salud pública

Desde hace algunas décadas, la salud mundial se encuentra afectada por la alta prevalencia de enfermedades transmisibles que llevan a una alta morbilidad y mortalidad, en especial en los países en vía de desarrollo. De las enfermedades transmisibles, las enfermedades emergentes y

reemergentes son las más frecuentes a causa del aumento de la población, la alta urbanización y los cambios en factores ambientales, sociales y sanitarios, entre otros aspectos [11, 12]. Las enfermedades transmisibles que afectan tanto a humanos como a animales [11] son causadas principalmente por virus que pueden ser transmitidos a vertebrados mediante la picadura de artrópodos hematófagos; estos virus reciben el nombre de arbovirus [13]. En la última década los artrópodos han sido los responsables de la transmisión de aproximadamente el 30% de las enfermedades emergentes [14], lo que los convierte en un serio problema de salud pública [15]; ello se debe a la amplia distribución de los vectores y a su capacidad vectorial, descrita como el conjunto de habilidades y características fisiológicas del artrópodo, que ligada a características de tipo ecológico, le permiten transmitir de forma eficiente un patógeno, en este caso, un virus [16].

De las arbovirosis, el dengue es una de las más frecuentes y constituye un serio problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países tropicales y subtropicales. La distribución del virus dengue es mundial y alrededor de 2,5 mil millones de personas viven en áreas de riesgo para su transmisión. Se estima que en los últimos 50 años la incidencia mundial de esta enfermedad ha aumentado 30 veces y se calcula que cada año se presentan aproximadamente 50 millones de casos de dengue [17]. Hasta el 2009, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) informó 853.468 casos de dengue en la región de las Américas; para el 2011, se informó un total de 1.040.000 casos con 719 muertes y los países más afectados fueron Bolivia, Colombia, Ecuador y Suriname [18].

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud notificó hasta el mes de diciembre del 2011 (semana epidemiológica número 52), 32.755 casos de dengue, de los cuales 31.372 correspondieron a dengue y 1.383 a dengue grave, 42 de estos últimos fueron letales (mortalidad del 3,04%). La mayoría de los casos de dengue se distribuyeron en Norte de Santander, Meta, Valle del Cauca, Santander, Tolima, Antioquia, Huila, Cesar, Sucre y Quindío [19]. Hasta el mes de mayo de 2012 (semana epidemiológica número 21), se notificaron 20.807 casos de dengue, de los cuales 20.241 correspondieron a dengue y 566 a dengue grave, y 11 fueron letales (mortalidad del 2,08%). Este mismo año, los departamentos más afectados son Huila, Meta, Valle del Cauca, Caquetá, Norte de Santander, Tolima, Santander, Casanare, Antioquia y Sucre [20].

Agente etiológico

El virus dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. Se han descrito cuatro serotipos antigenicamente diferentes, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. El genoma viral está constituido por un ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, el cual codifica para una poliproteína que se fragmenta por la acción de proteasas virales y celulares para originar 10 proteínas virales individuales, tres estructurales y siete no estructurales, como se observa en la **figura 1**. Las proteínas estructurales tienen funciones que incluyen desde el proceso de interacción con los receptores de la célula blanco (proteína E), pasando por la inducción de la respuesta antigenica, hasta la formación de las estructuras del virión (ver **figura 2**), mientras que las no estructurales son importantes para la replicación viral [21]; además, las estructuras secundarias de tipo tallo-bucle presentes en los extremos 5' y 3' de las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) facilitan y potencian la traducción de las proteínas virales [22].

El ciclo replicativo del virus dengue se inicia cuando un mosquito infectado pica a un huésped susceptible y le transfiere partículas virales infecciosas. Inicialmente, las partículas virales son capturadas por las células dendríticas intradérmicas (células de Langerhans) que se movilizan hacia los ganglios linfáticos locales (mientras el virus se replica) para realizar la

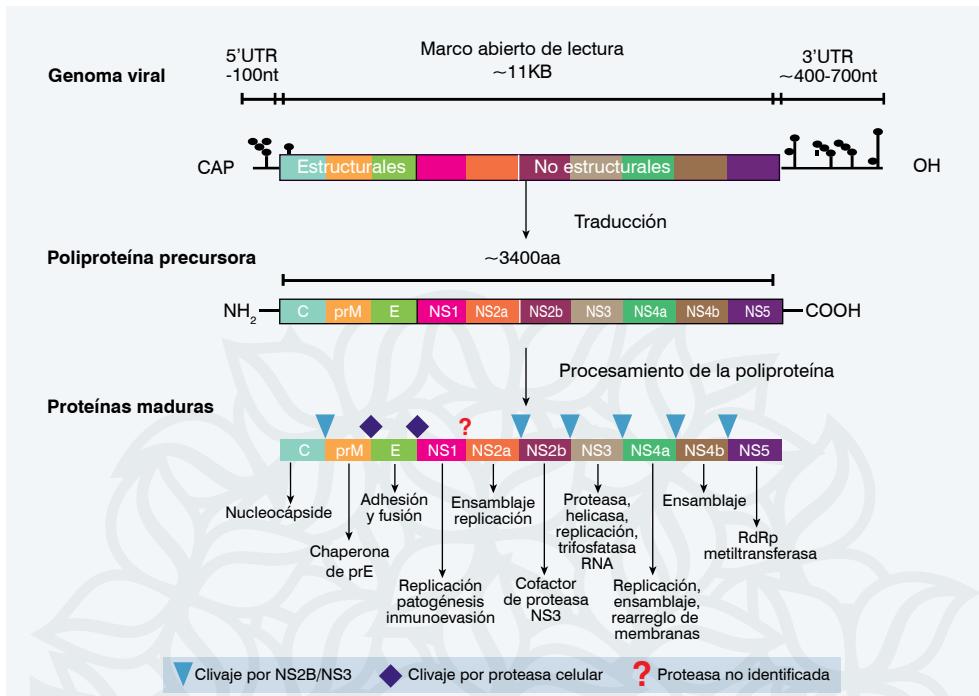


Figura 1. Estructura genómica del virus dengue. El virus posee un genoma ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva, con un tamaño de aproximadamente 11 kb que codifica para 10 proteínas: tres estructurales, C, prM y E; y siete no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5.

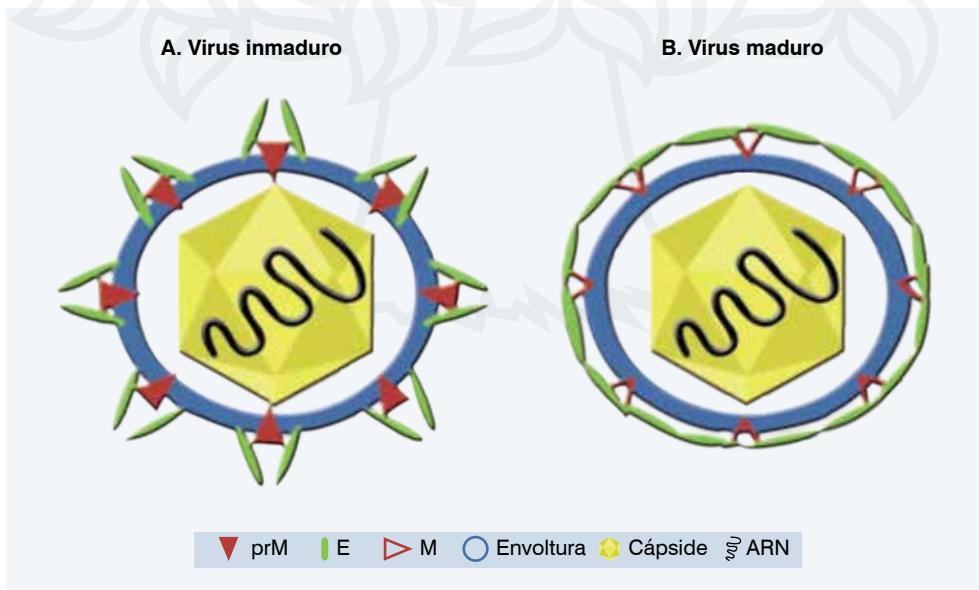


Figura 2. Estructura del virus dengue. A. Estructura de una partícula viral inmadura que posee la proteína prM asociada a la proteína E. B. Estructura de una partícula viral madura, caracterizada porque la proteína prM ya ha sido fragmentada y la proteína E es dimérica. Tomado y adaptado de **Martínez-Gutiérrez M.** Antiviral activity of lovastatin against dengue virus: evaluation *in vitro* and *in vivo*. [Tesis Doctoral]. Medellín, Universidad de Antioquia; 2010 [23].

presentación antigenica a los linfocitos T; simultáneamente, el virus infecta a otras células blanco de los ganglios, como los macrófagos y los linfocitos T [24]. El ciclo replicativo viral se esquematiza en la figura 3.

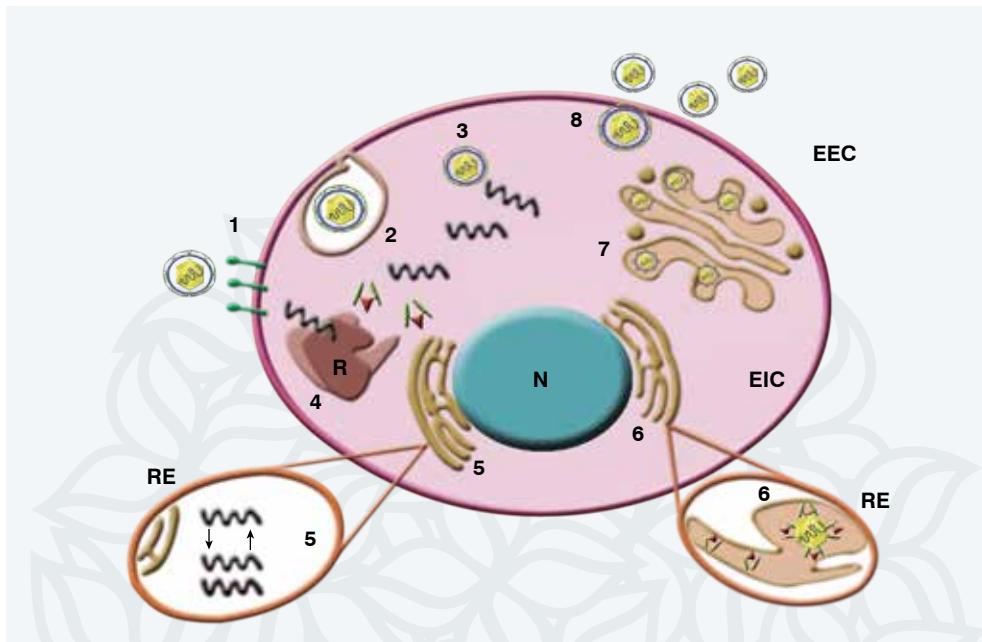


Figura 3. Ciclo replicativo del virus dengue. (1) Unión del virus a receptores presentes en la membrana plasmática. (2) Endocitosis mediada por clatrin. (3) Fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral. (4) Traducción de proteínas. (5) Replicación del genoma viral. (6) Ensamblaje de la partícula viral inmadura. (7) Maduración de la partícula viral. (8) Liberación por gemación de las partículas virales maduras. Convenciones: EEC, espacio extracelular; EIC, espacio intracelular; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; R, ribosoma. Tomado y adaptado de Martínez-Gutiérrez M. Antiviral activity of lovastatin against dengue virus: evaluation in vitro and in vivo. [Tesis Doctoral]. Medellín, Universidad de Antioquia; 2010 [23].

En general, para todos los tipos de células mencionadas el ciclo de replicación es el mismo, aunque varía el receptor celular utilizado por el virus para entrar en contacto con la célula; por ejemplo, para las células dendríticas el virus utiliza como receptores la lectina DC-SIGN (*Dendritic Cell-specific Intracellular adhesion molecule Grabbing Nonintegran*), la integrina $\alpha v\beta 3$ y la molécula GRP78 (BiP), mientras que para los monocitos utiliza moléculas como el heparán sulfato [25-27]. Posterior a la unión con los receptores celulares, el virus se internaliza a través de fosas recubiertas de clatrina [28], la envoltura del virus se fusiona con la membrana del endosoma y la partícula viral se expone a las proteasas celulares para que la desensamblen, de forma que el genoma se libera en el citoplasma. A continuación, se da una intensa proliferación y reorganización de endomembranas en las células hospederas para transportar los componentes virales [29]. El genoma liberado en el citoplasma cumple dos funciones, puede servir como ARN mensajero y traducirse en una sola poliproteína en el retículo endoplasmático rugoso o puede servir como molde para hacer más copias del genoma. La poliproteína traducida es procesada por proteasas virales (NS3) y celulares (peptidasas residentes en el retículo endoplasmático) [30], lo que lleva a la formación de tres proteínas estructurales, C, prM y E, y siete no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5.

Durante la síntesis de ARN viral participan las proteínas no estructurales del virus, siendo de particular importancia la función realizada por NS3 y NS5; NS3 actúa como helicasa y NTPa-

sa, mientras que NS5 es una metiltransferasa y actúa como ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); para cumplir su función, estas proteínas utilizan cofactores virales como NS1 y NS2B. Las demás proteínas no estructurales se relacionan con la inhibición de algunos factores proinflamatorios necesarios para la respuesta inmune de la célula hospedera. Durante la síntesis del ARN, inicialmente se genera una hebra de polaridad negativa, la cual servirá como molde para la formación de nuevas copias de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, estas hebras nuevas se dirigirán al ribosoma, donde se traducirán en proteínas o se ensamblarán junto con las proteínas para la formación de un virión inmaduro [31].

Las nuevas copias de ARN de polaridad positiva son internadas por la proteína C; posteriormente, el virus adquiere la bicapa lipídica de la membrana del retículo endoplasmático y las partículas virales se transportan a través de vesículas por el sistema exocítico hasta el aparato de Golgi, en donde, a través de furinas, la proteína prM es separada en Pr y M, esta última es la forma madura. Una vez el virión madura por completo, se libera al medio extracelular a través de la fusión entre la vesícula transportadora y la membrana plasmática; este proceso se conoce como gemación, el cual se caracteriza principalmente por no producir la lisis celular [32-34].

Clasificación clínica del dengue

El dengue es una enfermedad que se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas que pueden ser graves o no graves [35, 36]. Estas manifestaciones permiten clasificar la enfermedad, de acuerdo con los criterios actuales propuestos por la OMS, como dengue (conocido anteriormente como dengue clásico o fiebre de dengue) o como dengue grave (conocido anteriormente como fiebre hemorrágica de dengue) [17].

El dengue cursa con manifestaciones clínicas como fiebre, náuseas, vómito, malestar general, eritema, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias, cefalea, petequias y sangrado de mucosa; estos síntomas se presentan en la fase febril que dura entre tres y cinco días. Posteriormente, la fiebre disminuye, aumenta el hematocrito a causa del incremento de la permeabilidad vascular con la consecuente extravasación de los líquidos, y también se presenta una marcada y progresiva leucopenia y trombocitopenia, lo que da lugar a la fase crítica, que dura entre 24 y 48 horas. Finalmente, en la fase de recuperación, la cual ocurre en aquellos pacientes que logran sobrevivir a la fase crítica, se produce la reabsorción de líquidos extravasulares, mejora el estado general, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se normaliza el hematocrito y el recuento de leucocitos y, posteriormente, se normaliza el recuento de plaquetas [17].

Por su parte, el dengue grave se caracteriza por la extravasación de plasma, lo que puede originar choque por dengue, con o sin insuficiencia respiratoria, sangrados graves y deterioro de órganos. Estos pacientes pueden presentar alteraciones como hipoxia y acidosis, lo que puede conducir a una coagulación intravascular diseminada o a una insuficiencia multiorgánica, en la cual se afecta principalmente el hígado, el corazón o el cerebro [17].

Se han identificado diferentes factores que pueden desencadenar el dengue grave; estos involucran tanto al virus como al hospedero. De los factores asociados al virus, los serotipos DENV-4 y DENV-2 son más patogénicos que DENV-3 y DENV-1 [37, 38]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las cepas del genotipo del sudeste asiático de DENV-2 son más virulentas que las cepas de otros genotipos, incluso se ha evidenciado un desplazamiento de las cepas locales del continente americano, por cepas pertenecientes al genotipo del sudeste

asiático [39]. Además, DENV-2 se ha relacionado con las formas de dengue grave, principalmente en los casos de infecciones secundarias, ya que los pacientes con infección secundaria por este serotipo presentan títulos virales más altos que los pacientes con infección secundaria por cualquiera de los otros serotipos [40].

Entre los factores de riesgo relacionados con el hospedero se encuentran las infecciones en menores de 15 años, en personas de la tercera edad, en mujeres gestantes o en personas con enfermedades de base como la diabetes o la desnutrición; pero, el principal factor de riesgo es la preexistencia de anticuerpos no neutralizantes en segundas infecciones, fenómeno conocido como potenciación dependiente de anticuerpos, el cual se puede explicar por el hecho de que gran parte de la población ya se encuentra inmunizada contra otros serotipos que han estado circulando, pues la infección con un serotipo recientemente introducido para el cual no existen anticuerpos neutralizantes pero sí anticuerpos heterólogos no neutralizantes, hacen que la población sea más susceptible de desarrollar las formas severas de la enfermedad. En las últimas décadas, la circulación simultánea de varios serotipos ha sido un agravante para Colombia [41] y para toda América, siendo los serotipos DENV-2 y DENV-3 los más frecuentes [42]. Además, en la década de los años ochenta se informaron los primeros cuadros clínicos de dengue grave relacionados con la introducción del genotipo asiático de DENV-2 [42]; lo anterior, sumado a la reemergencia del serotipo 3 en el continente americano en los últimos años [43], pudo ser una de las causas para las graves epidemias de las últimas décadas [36, 44, 45].

Según la OMS, la infección por el virus dengue también se puede clasificar como primaria, cuando un individuo se infecta por primera vez con alguno de los serotipos, o en secundaria, cuando una persona se expone a una reinfección con el mismo serotipo o con uno diferente al de la infección primaria. En una infección primaria se desarrolla una respuesta de anticuerpos caracterizada por un aumento lento de anticuerpos específicos tipo IgM, los cuales se pueden detectar entre el tercer a quinto día de la aparición de la enfermedad; dichos anticuerpos aumentan en un 80% y un 99% para el día quinto y décimo, respectivamente. Por su parte, los anticuerpos IgG aparecen en títulos bajos al finalizar la primera semana de la enfermedad y aumentan lentamente hasta que se detectan por varios meses e incluso de por vida [17]. En una infección secundaria los títulos de anticuerpos se elevan rápidamente, los tipo IgG predominan aun en la fase aguda y persisten por 10 meses hasta de por vida, mientras que los anticuerpos tipo IgM pueden aparecer en muy bajos títulos en la etapa de convalecencia y en algunos casos son casi indetectables (ver figura 4).

La importancia del diagnóstico en el dengue

La sintomatología que se presenta durante la infección por el virus dengue orienta el diagnóstico clínico, el cual es de tipo presuntivo; sin embargo, muchos de los síntomas también se pueden presentar en infecciones producidas por otros agentes etiológicos, lo que puede llevar a falsos positivos o falsos negativos. Es por ello, que el diagnóstico se debe confirmar mediante pruebas de laboratorio [47]. Adicionalmente, en Colombia, teniendo en cuenta las normas del Ministerio de Salud y Protección Social, es de carácter obligatorio notificar los casos a las instituciones responsables de la vigilancia epidemiológica [48]. Por lo tanto, las Instituciones Prestadoras de Salud se encargan de notificar los casos sospechosos de dengue a las instituciones de vigilancia del Gobierno, ya sean departamentales o estatales, que casi siempre son quienes realizan la confirmación de los casos.

De otro lado, la notificación de los casos confirmados por los métodos diagnósticos no solo debe servir para la vigilancia epidemiológica, sino para acercar al personal clínico al trata-

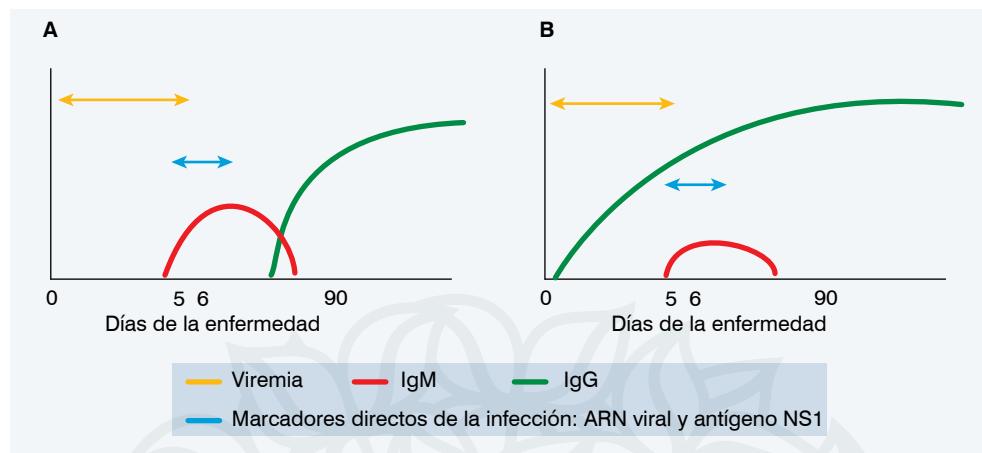


Figura 4. Cinética de la producción de anticuerpos, de la viremia y de los marcadores directos de la infección por el virus dengue. **A.** En la infección primaria se detectan anticuerpos tipo IgM a partir del tercer día de la aparición de los síntomas, predominando hasta el séptimodía. A partir de la primera semana, se detectan anticuerpos IgG. **B.** En la infección secundaria predomina la presencia de anticuerpos IgG, los cuales se elevan rápidamente y perduran aun en la etapa de convalecencia. En los dos tipos de infección se puede detectar el virus desde el día cero hasta el séptimo día y los marcadores directos se pueden detectar desde el día quinto. Tomado y modificado de: **Centers for Disease Control and Prevention.** Dengue. Laboratory guidance and diagnostic testing. 2010. <http://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html> [46].

miento correcto de los pacientes con dengue. Aunque el diagnóstico presuntivo es el primer acercamiento para el abordaje terapéutico, no es posible aplicar una intervención adecuada si no se establece con claridad el agente etiológico causante de la enfermedad. De esta manera, se evita confundirla con otras enfermedades con las que comparte sintomatología y se puede estar alerta frente a las posibles epidemias y al aumento de casos graves relacionados con la circulación de variantes más virulentas o relacionados con las infecciones secundarias [49, 50].

Técnicas para el diagnóstico de la infección por el virus dengue

A través de los años se han implementado diferentes técnicas diagnósticas, que abarcan desde las técnicas celulares hasta las moleculares, pasando por las inmunológicas, que son las más comunes [6, 51]. En general, las técnicas de diagnóstico se pueden clasificar como directas, si identifican partículas virales completas o proteínas que actúan como antígenos; o indirectas, si identifican la respuesta inmune que induce la infección por un virus (presencia de anticuerpos específicos). También se pueden clasificar de acuerdo con su fundamento en técnicas de aislamiento viral, inmunológicas y moleculares.

En Colombia, el sistema de vigilancia de dengue tiene establecida la notificación de los casos y el posterior envío de las muestras sospechosas para que sean confirmadas en los Laboratorios Departamentales de cada región o en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud en Bogotá. Sin embargo, los reportes sugieren deficiencias en el sistema de notificación y, en especial, en el procesamiento de las muestras, no por falta de capacitación del personal, sino por las condiciones de consulta del paciente, quien con frecuencia una vez se recupera, no accede a una segunda toma de muestras para obtener sueros pareados que permitan confirmar con mayor confianza la infección causada por este virus [52]. A continuación se describirán algunos aspectos relacionados con las técnicas de aislamiento viral.

Técnicas de aislamiento viral

Las técnicas de aislamiento viral permiten separar, cultivar e identificar el virus a partir de diferentes tipos de muestras, de las cuales las más comunes son el suero o el plasma. Existen tres métodos para el aislamiento del virus dengue: inoculación intracerebral de ratones recién nacidos, inoculación de mosquitos susceptibles e infección de cultivos de células derivadas de mamíferos (líneas celulares Vero, BHK-21, LLCMK2) o de mosquito (células C6/36 de *Aedes albopictus* y AP-61 de *Aedes pseudoscutellaris*) [53-56]. El uso de estas técnicas está ligado, en primera instancia, al momento de la toma de la muestra, ya que es indispensable que la muestra para aislamiento sea tomada de pacientes en fase aguda o máximo a los seis días desde el inicio de los síntomas y, en segunda instancia, a las condiciones de almacenamiento, las cuales son de gran importancia, pues la conservación a una temperatura inadecuadas puede llevar a la disminución de la viabilidad del virus y por tanto, a la disminución del éxito de la prueba [57].

Aislamiento en cultivo celular

Las líneas celulares obtenidas a partir de mosquitos son las que más se utilizan para aislar todos los serotipos del virus dengue. Estas células provienen de las larvas de *Aedes albopictus* (C6/36), *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) y *Toxorynchites amboinensis* (Tra-284). En algunos casos existen subclones obtenidos a partir de algunas de ellas y con características de crecimiento diferentes, como las líneas AP64 y CLA-1 (obtenidas a partir de AP61) y la línea C6/36 HT (obtenida a partir de células C6/36 y con capacidad de crecer a 33°C). Estas líneas se consideran más sensibles a la replicación viral que las de origen mamífero, como también son más fáciles de cultivar y más susceptibles a la formación de efecto citopático de tipo sincitio o células gigantes multinucleadas [6, 55, 58-60]. En la figura 5 se observa el efecto citopático característico de cada uno de los cuatro serotipos de referencia obtenidos del National Institute for Biological Standards and Control en células C6/36 HT.

Por otro lado, las líneas celulares de mamíferos que se utilizan para el aislamiento del virus dengue son las células LLCMK2 (células epiteliales de riñón de mono Rhesus *Macaca mulatta*), VERO (células epiteliales renales del mono verde africano) y BHK21 (fibroblastos de riñón de hámster). De estas líneas, la más sensible es LLCMK2. Sin embargo, la sensibilidad de las líneas de mamífero puede variar dependiendo del serotipo o de la cepa infectante. En general, todas estas líneas celulares requieren de un periodo de tiempo mayor que las células de mosquito y de varios pases ciegos para obtener títulos virales altos [6, 61]. Adicionalmente, la visualización del efecto citopático también depende del serotipo viral y del tipo de célula y, en algunos casos, a pesar de que las células están infectadas, no se observa dicho efecto [59]. En la figura 6 se observan cultivos de células VERO infectados con los cuatro serotipos virales y los cambios morfológicos asociados a la infección con cada uno de ellos.

Independiente del tipo de célula usada para el aislamiento, la muestra se debe obtener durante el periodo de viremia, es decir, entre el primer y el quinto día del inicio de los síntomas. Adicionalmente, se requiere un cuarto de cultivo celular con cabinas de bioseguridad tipo II para disminuir el riesgo de infección del personal encargado del procedimiento. Posterior a la inoculación de las líneas celulares, éstas se deben incubar de acuerdo con las condiciones establecidas para cada línea y se deben observar diariamente, aproximadamente durante siete a nueve días hasta evidenciar el efecto citopático, el cual dependerá del serotipo causante de la infección. Al finalizar el periodo de incubación, se debe realizar una inmunofluorescencia que permitirá la confirmación de la infección, ya que los cambios celulares por efectos de la infección y la replicación del virus no son diagnósticos [17, 55, 62]. Además, es importante tener

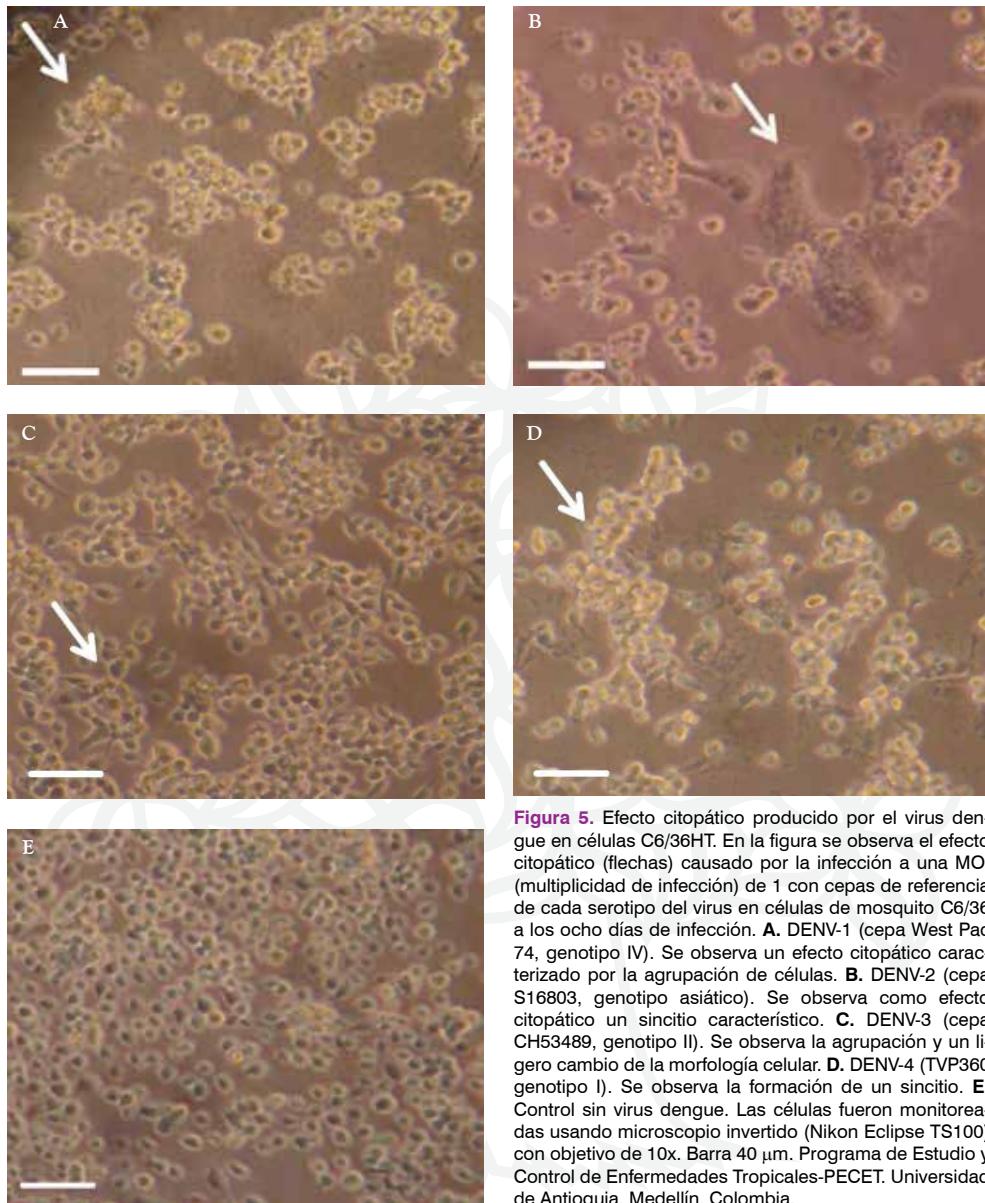


Figura 5. Efecto citopático producido por el virus dengue en células C6/36HT. En la figura se observa el efecto citopático (flechas) causado por la infección a una MOI (multiplicidad de infección) de 1 con cepas de referencia de cada serotipo del virus en células de mosquito C6/36 a los ocho días de infección. **A.** DENV-1 (cepa West Pac 74, genotípo IV). Se observa un efecto citopático caracterizado por la agrupación de células. **B.** DENV-2 (cepa S16803, genotípo asiático). Se observa como efecto citopático un sincitio característico. **C.** DENV-3 (cepa CH53489, genotípo II). Se observa la agrupación y un ligero cambio de la morfología celular. **D.** DENV-4 (TVP360 genotípo I). Se observa la formación de un sincitio. **E.** Control sin virus dengue. Las células fueron monitoreadas usando microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) con objetivo de 10x. Barra 40 μ m. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

en cuenta que los valores de sensibilidad y de especificidad reportados para aislamiento viral cuando se compara con las pruebas serológicas son del 26,7% y del 73,2%, respectivamente, debido principalmente al almacenamiento de las muestras en condiciones de temperatura inadecuadas. En la figura 7 se observan cultivos de células C6/36HT a los que se le realizó inmunofluorescencia a los siete días de infección y se confirmó la presencia del virus.

Inoculación en mosquitos

La inoculación de mosquitos es una técnica con alta sensibilidad y es el método de elección para determinar la presencia del virus dengue, especialmente en los pacientes que fallecieron.

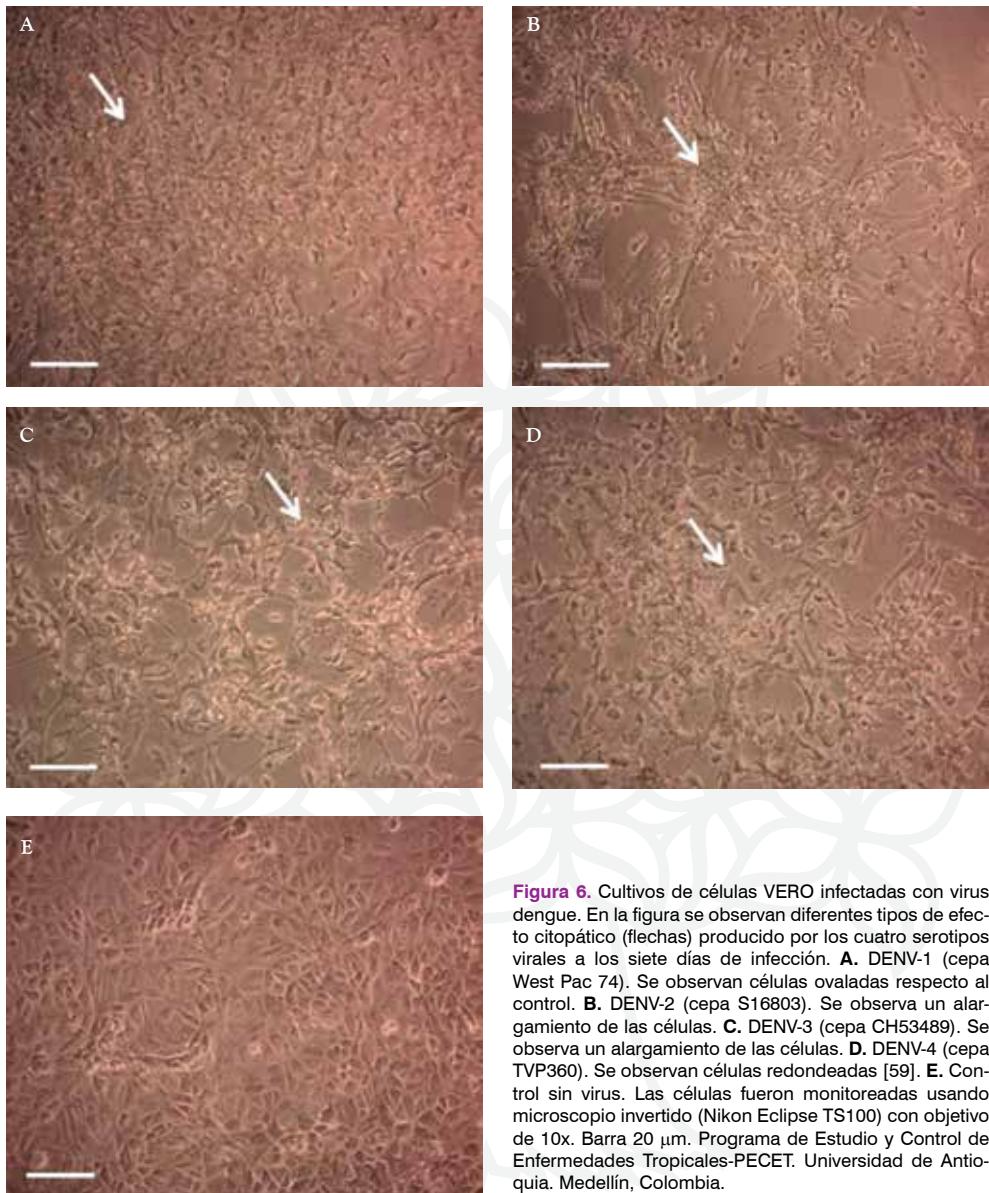


Figura 6. Cultivos de células VERO infectadas con virus dengue. En la figura se observan diferentes tipos de efecto citopático (flechas) producido por los cuatro serotipos virales a los siete días de infección. **A.** DENV-1 (cepa West Pac 74). Se observan células ovaladas respecto al control. **B.** DENV-2 (cepa S16803). Se observa un alargamiento de las células. **C.** DENV-3 (cepa CH53489). Se observa un alargamiento de las células. **D.** DENV-4 (cepa TVP360). Se observan células redondeadas [59]. **E.** Control sin virus. Las células fueron monitoreadas usando microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) con objetivo de 10x. Barra 20 μ m. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Los mosquitos *Aedes albopictus* y *Toxorhynchites amboinensis* son de gran utilidad para el aislamiento del virus. Sin embargo, esta técnica resulta difícil y costosa por la infraestructura que se requiere, puesto que no todos los laboratorios de virología cuentan con un insectario para el mantenimiento de las colonias de mosquitos y su posterior inoculación, ni con el personal capacitado para tal fin. Además, estos procedimientos se deben llevar a cabo en condiciones de bioseguridad, como barreras físicas que impidan que los mosquitos infectados puedan volar, o el uso de mosquitos no hematófagos como *Toxorhynchites amboinensis*, de manera que se disminuya el riesgo de infección del personal de laboratorio. Una vez se logra inocular los mosquitos, el virus puede ser aislado de intestino medio luego de siete días de infección o de glándulas salivales después de 12 días, pero los requerimientos de un personal capacitado en la manipulación de los mosquitos limita el uso de esta metodología [55, 63, 64].

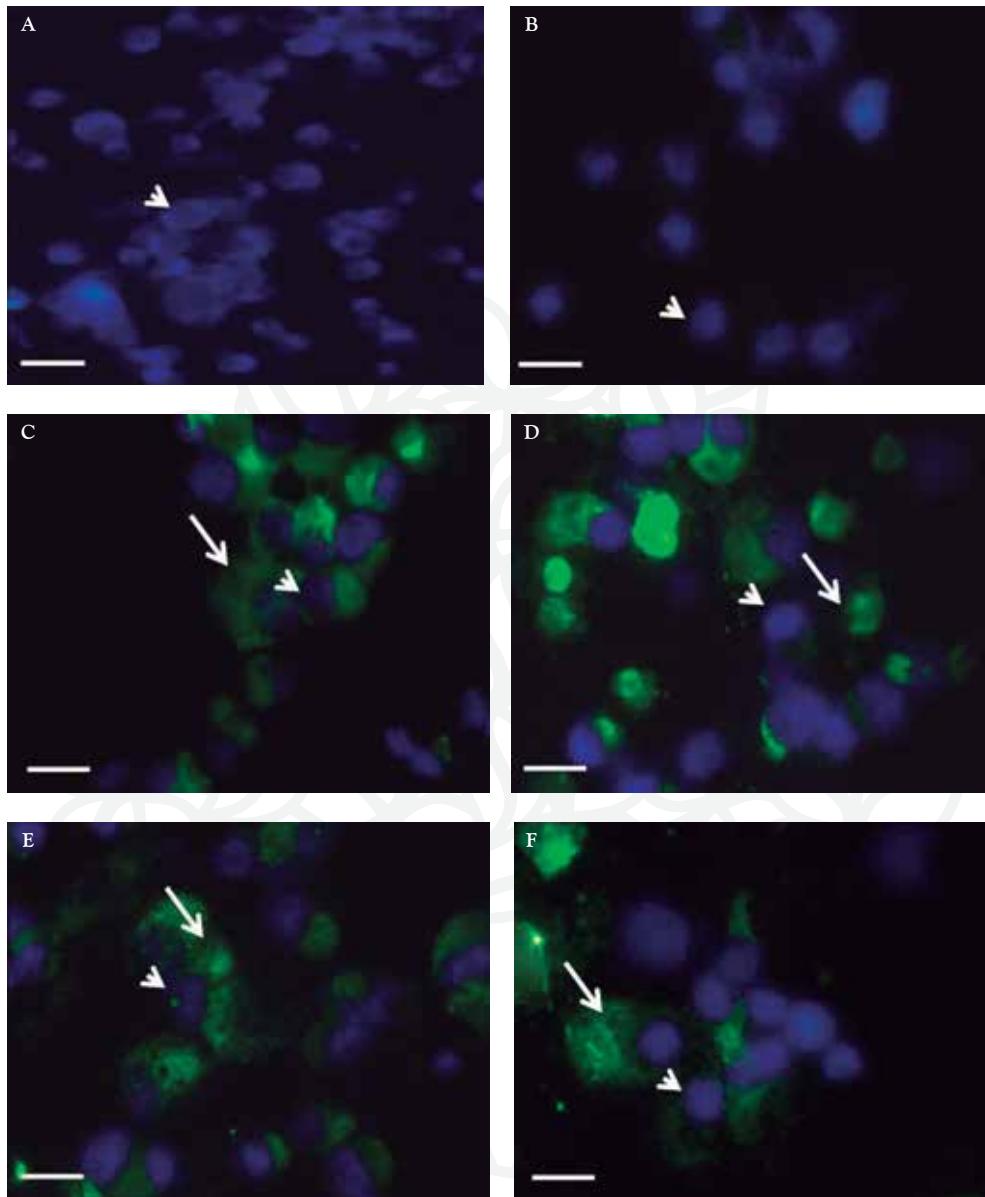


Figura 7. Detección por inmunofluorescencia directa de la infección por virus dengue de células C6/36 HT a una MOI de 1 (multiplicidad de infección). La tinción verde (flecha), correspondiente a isotiocianato de fluoresceína, indica la presencia de antígeno viral específico y la azul (punta de flecha) indica la presencia del núcleo celular (bisbenzimida). **A.** Control sin virus. **B.** Control sin anticuerpo primario. **C.** Infección por DENV-1 (mAb D2-1F1-3). **D.** Infección por DENV-2 (mAb 3H51-21). **E.** Infección por DENV-3 (mAb D6 8A1-12). **F.** Infección por DENV-4 (mAb 1H10-6-7). Las láminas se observaron en microscopio de epifluorescencia Nikon EFD-3 con objetivo de 40x y las imágenes fueron capturadas con cámara fotográfica digital para microscopio tipo CCD de 12,5 megapixels (Nikon). Barra: 10 μ m. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Inoculación intracerebral de ratones

La inoculación intracerebral para el aislamiento viral es un método tradicional usado desde la década de los años cuarenta. Consiste en la infección de ratones de uno a dos días de nacidos; en éstos, se presenta una afección del sistema nervioso central caracterizada por la parálisis

del animal. Los síntomas dependen de la carga viral y de la patogenicidad de la cepa inoculada. Una vez se desarrollan los signos de la encefalitis causada por la infección, se puede identificar partículas o antígenos virales a partir del tejido cerebral por diferentes métodos, como la fluorescencia o la microscopía electrónica. Esta metodología se considera poco sensible, costosa y requiere de mucho tiempo para su ejecución [54, 55].

Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas permiten la detección de anticuerpos (métodos indirectos) o de antígenos (métodos directos) presentes en el suero de un paciente infectado. Estas técnicas se basan en reacciones antígeno-anticuerpo (formación de inmunocomplejo), las cuales se pueden evidenciar por métodos de precipitación, aglutinación, fluorescencia, actividad enzimática o lisis celular [54, 65, 66]. Teniendo en cuenta el curso clínico de la enfermedad y el comportamiento de la respuesta inmune (en una infección primaria o secundaria), la OMS recomienda el uso de sueros pareados, es decir, una muestra de suero tomada en fase aguda y otra tomada en fase convaleciente, pues dada la seroconversión (suero en fase aguda negativo para IgM y suero en fase convaleciente positivo para IgG), la cuadruplicación de los títulos lleva a un diagnóstico positivo de dengue [67, 68]. A continuación se describen las técnicas inmunológicas disponibles para el diagnóstico de la infección por el virus dengue.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia permite la detección de antígenos luego del aislamiento viral. En la figura 8 se esquematizan los dos tipos de inmunofluorescencia usados en diagnóstico de dengue: directa e indirecta. La primera detecta antígenos virales en cultivos celulares mediante el uso de anticuerpos primarios dirigidos contra el virus y marcados con fluorocromos, mientras que la segunda también detecta antígenos virales, pero en este caso se utiliza un anticuerpo primario dirigido contra proteínas virales y un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo, y este último anticuerpo reconoce al primario. Al comparar estas dos técnicas, la inmunofluorescencia indirecta resulta ser más sensible que la directa, debido a que se genera una amplificación de la señal por la adición del anticuerpo secundario [69].

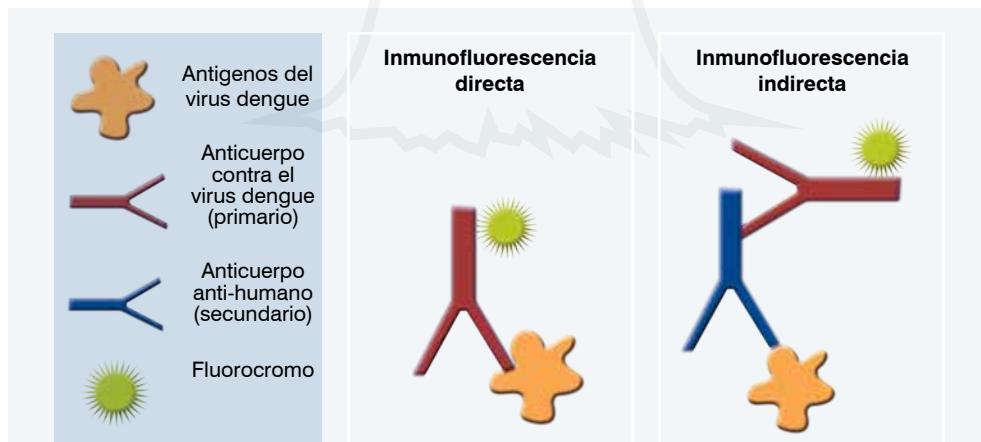


Figura 8. Técnica de inmunofluorescencia utilizada para diagnóstico de dengue. En la inmunofluorescencia directa se detectan antígenos virales por medio de un anticuerpo primario unido a un fluorocromo, mientras que en la inmunofluorescencia indirecta se usa un anticuerpo secundario unido al fluorocromo.

Inhibición de la hemaglutinación

La hemaglutinación es una técnica que permite la detección de un virus por la capacidad que tiene(n) alguna(s) de sus proteína(s) de envoltura para aglutinar eritrocitos de una especie animal determinada o de un humano. Existe una variante de esta técnica que es la inhibición de la hemaglutinación o hemaglutinación indirecta, en la que se detectan anticuerpos específicos dirigidos contra el virus; dichos anticuerpos evitan la aglutinación de los glóbulos rojos en presencia del virus (ver figura 9). Para ello, el suero del paciente, en donde se presume hay anticuerpos específicos, se pone en contacto con el virus y posteriormente se agrega glóbulos rojos. Si en el suero hay anticuerpos que reconocen al virus, se unirán a éste y se inhibirá la hemaglutinación. Esta técnica requiere de cuidados especiales para su buen funcionamiento, como el pH, el tiempo y la temperatura de incubación [54, 65, 70].

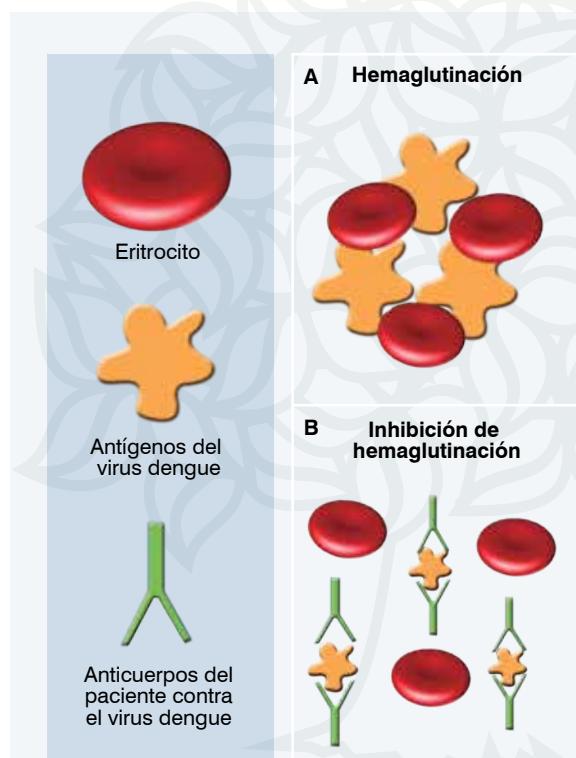


Figura 9. Técnica de inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de dengue. **A.** Si el paciente no tiene anticuerpos específicos contra el virus dengue, los antígenos virales inducen la hemaglutinación (resultado negativo). **B.** Cuando en el suero del paciente hay anticuerpos específicos contra el virus dengue, se inhibe la aglutinación (resultado positivo).

dadas las facilidades técnicas y el poco consumo de tiempo de esta técnica, muchos laboratorios a nivel mundial todavía la usan como la principal herramienta diagnóstica [65, 76]. Sin embargo, existe una amplia reactividad cruzada en infecciones secundarias con virus dengue o en infecciones por otros arbovirus, incluyendo aquellos para los cuales se pueden generar anticuerpos después de la vacunación, por ejemplo, el virus de la fiebre amarilla [77]; por lo tanto, se reduce su efectividad en el diagnóstico y ha sido remplazada por otras técnicas, como ELISA [78].

En 1958, Clake y Casals propusieron esta técnica. Para ello, utilizaron antígenos virales obtenidos a partir de cerebros de ratones lactantes infectados y purificaron los antígenos mediante el método de sacarosa acetona [71-73]. En el caso del virus dengue, éste aglutina eritrocitos de ganso y eritrocitos humanos del grupo O mediante la glicoproteína E, la cual tiene características de hemaglutinina, por lo que los anticuerpos presentes en el suero de pacientes infectados se unen a los antígenos virales y se inhibe la hemaglutinación [65, 74, 75].

La inhibición de la hemaglutinación es un método sensible (97,5%) para la detección de anticuerpos y específico (98,7%) contra el virus dengue, y es especialmente útil para identificar IgM en infecciones primarias, tanto en la fase aguda de la enfermedad como en la fase de convalecencia. Adicionalmente,

necesarios para la realización de

Fijación del complemento

Hasta hace unas décadas, la inhibición de la hemaglutinación se utilizaba de rutina para evaluar las muestras de pacientes sospechosos de infección por el virus dengue. A las muestras con resultado sugestivo de infección por dengue se les realizaba la técnica de fijación del complemento para confirmar el diagnóstico, ya que tanto la sensibilidad como la especificidad de estas pruebas pueden ser comparables [66, 72, 73, 79, 80].

La fijación de complemento permite la detección de anticuerpos específicos contra el virus. Esta técnica se realiza en dos etapas; en la primera se mezcla el suero del paciente sospechoso de tener anticuerpos contra el virus, lo que generará un inmunocomplejo, y en la segunda se adiciona el complemento, una hemolisina dependiente de complemento y glóbulos rojos. Si en la primera etapa se formaron inmunocomplejos, en la segunda el complemento se fijará a éstos y no se producirá la lisis de los glóbulos rojos. Por el contrario, si no hubo formación de complejos antígeno-anticuerpo, no se fijará el complemento y la hemolisina inducirá la lisis de los glóbulos rojos [65, 70] (ver figura 10).

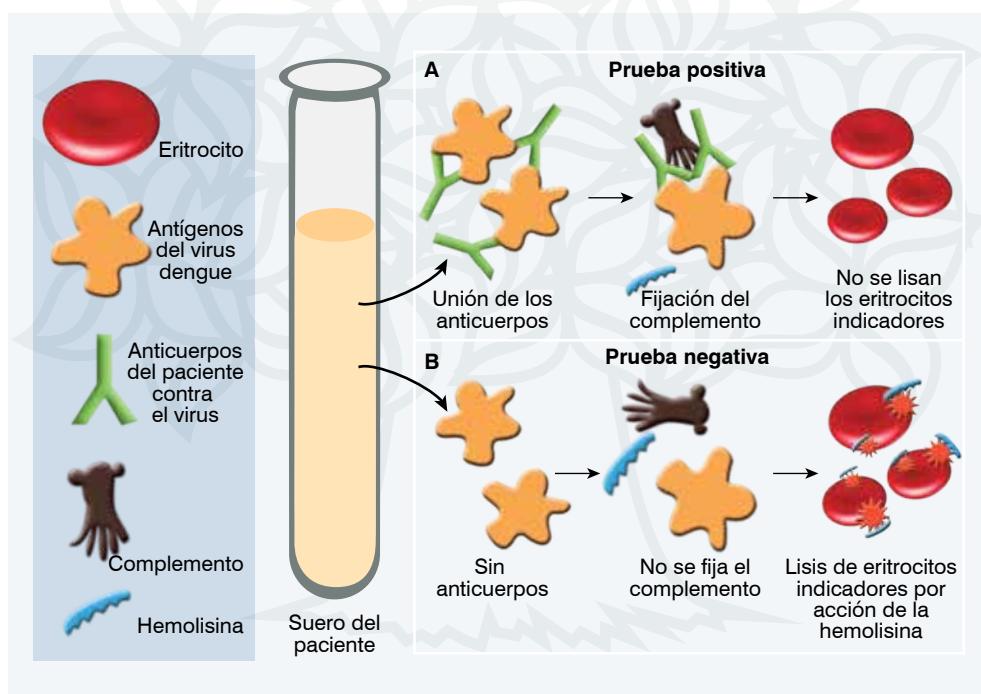


Figura 10. Técnica fijación del complemento para el diagnóstico de dengue. **A.** Si el suero del paciente contiene anticuerpos contra antígenos del virus, al adicionar el complemento, éste fijará al complejo antígeno-anticuerpo y no se lisarán los eritrocitos, lo que indica que la prueba es positiva. **B.** En un paciente sin anticuerpos contra el virus, no se forman inmunocomplejos, por lo que no se fija el complemento y la hemolisina induce la lisis de los glóbulos rojos.

ELISA

La técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) fue inventada en los años sesenta y su aplicación en la detección temprana de diferentes analitos y agentes patógenos se intensificó en los años setenta y ochenta. Esta técnica permite la detección de anticuerpos tipo IgG o IgM o de antígenos virales, y se basa en el uso de una enzima que reacciona con un sustrato

específico, lo cual produce un cambio de color del cromógeno, evidenciando la formación de inmunocomplejos. La técnica de ELISA permite obtener no solo un resultado cualitativo, sino semi-cuantitativo (con títulos de antígeno o anticuerpos) [81, 82].

En 1979, Dittmar y colaboradores describieron un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM contra el virus dengue. Para ello, obtuvieron antígenos virales a partir de cerebros de ratones lactantes que habían sido infectados con el virus; los antígenos se absorbían a la fase sólida y luego se adicionaba el suero del paciente. La reacción con los anticuerpos presentes en el suero del paciente (IgG o IgM) se evidenciaba con una anti-inmunoglobulina conjugada con fosfatasa alcalina y cuando había una reacción positiva, ocurría el cambio de color [73] (ver figura 11). Al comparar los resultados obtenidos en ese momento, concluyeron que la nueva técnica de ELISA estandarizada permitía detectar IgM específica para el virus dengue, resultado que no podía ser obtenido mediante la inhibición de la hemaglutinación [83].

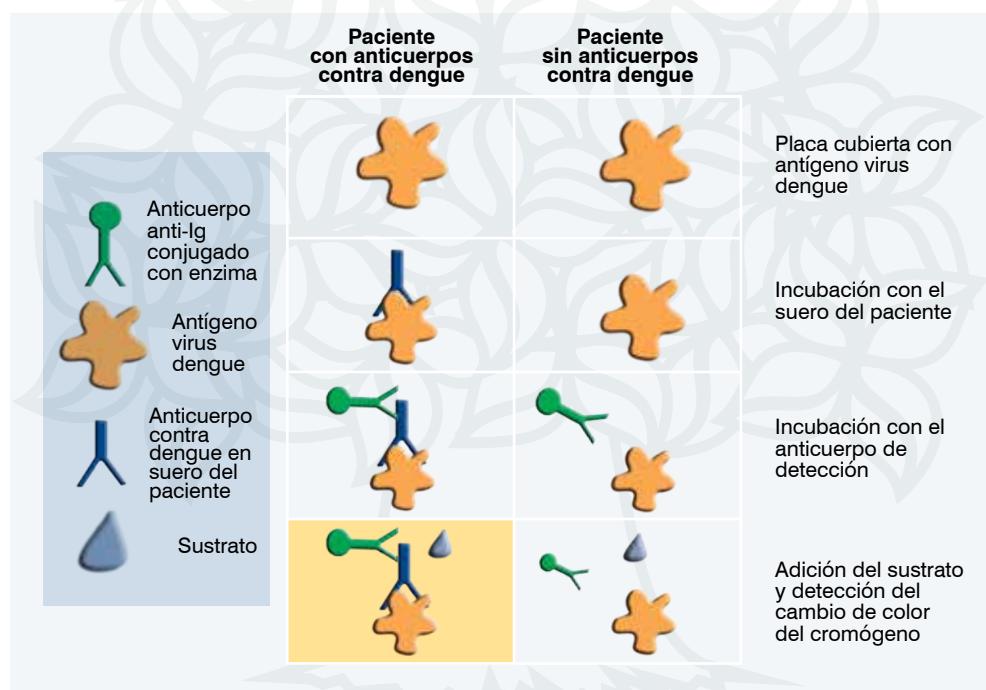


Figura 11. Técnica de ELISA para el diagnóstico de dengue. (1) Placa cubierta con antígenos del virus. (2) Se adiciona el suero del paciente y se incuba. (3) Se adiciona anticuerpo detector unido a la enzima (4) Se adiciona sustrato enzimático y se produce el cambio de color (prueba positiva), el cual es proporcional a la concentración de anticuerpos del paciente.

Los diferentes tipos de ELISA han permitido la detección de IgM o IgG, ya sea por separado o combinados. La sensibilidad de ELISA para detectar sólo IgM es del 78%, mientras que la sensibilidad de ELISA que detecta sólo IgG es del 59%; sin embargo, ello varía dependiendo del tipo de infección (primaria o secundaria) y del momento en que se tome la muestra. Al utilizar un ELISA combinado para la detección simultánea de IgG e IgM, la sensibilidad aumenta a 100% en las infecciones primarias y a 98% en las infecciones secundarias. En la actualidad se dispone de un gran número de estuches de ELISA comerciales, por lo que se ha convertido en la técnica de elección en la mayoría de los laboratorios clínicos [84, 85].

Mac-ELISA

La prueba de captura de anticuerpos IgM (Mac-ELISA) se basa en la captura total de IgM presente en el suero del paciente mediante el uso de anticuerpos anti-IgM humana, los cuales están adheridos a las fase sólida de la placa; posteriormente, se adicionan antígenos de dengue y anticuerpos (monoclonales o polyclonales) específicos contra él. La reacción, al igual que en la técnica de ELISA convencional, se evidencia mediante el cambio de color del cromógeno, producto de la reacción de la enzima (unida al anticuerpo) sobre el sustrato (**figura 12**). En el caso del virus dengue, los antígenos pueden corresponder a una mezcla de los cuatro serotipos o a cada uno de los serotipos virales, por lo que en este último caso también tiene utilidad en la serotipificación [17]. En general, los sistemas ELISA más utilizados en los laboratorios de rutina se basan en ELISA de captura de anticuerpos tipo IgM para los cuatro serotipos, constituyéndose en uno de los sistemas más rápidos, económicos y útiles para el diagnóstico y la vigilancia del virus dengue [86]. Sin embargo, así como algunos pacientes tienen títulos de IgM detectables desde el segundo o cuarto día de aparición de los síntomas, otros tardan hasta ocho días para lograr títulos detectables mediante ELISA [54].

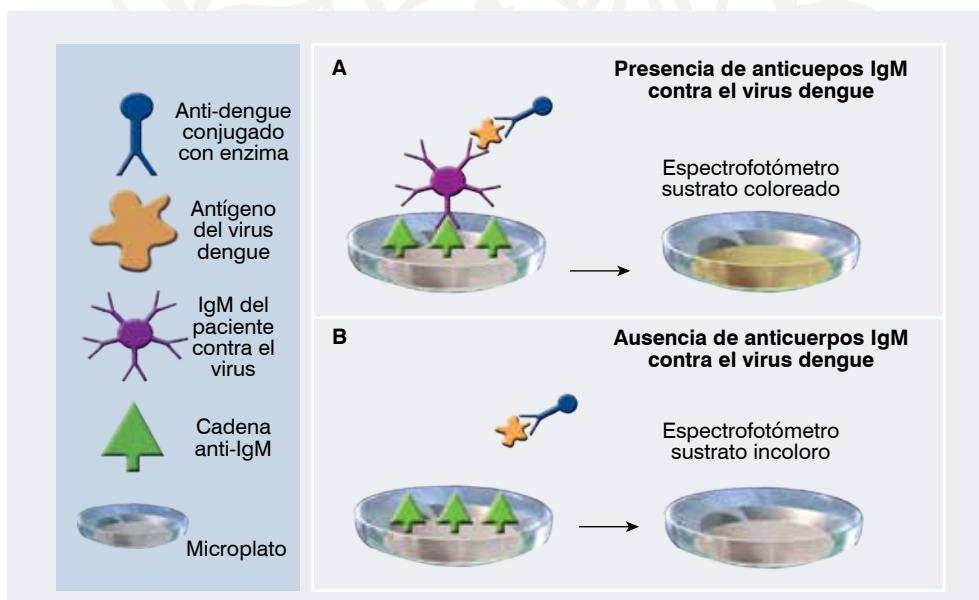


Figura 12. Mac-ELISA para el diagnóstico de dengue. **A.** Las placas están recubiertas con anticuerpos anti-IgM, los cuales capturan la IgM presente en el suero del paciente infectado, y a éstas se une el antígeno del virus dengue; posteriormente, se une el anticuerpo anti-dengue conjugado con la enzima y al reaccionar con el sustrato se produce cambio en el color (prueba positiva). **B.** Las placas están recubiertas con anticuerpos anti-IgM, pero si el paciente no tiene anticuerpos IgM contra el virus, no se forma el inmunocomplejo y por lo tanto no se une el anticuerpo anti-dengue conjugado con la enzima y no se produce cambio de color (prueba negativa).

Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas se utilizan para detectar tanto antígeno viral, específicamente la proteína NS1 del virus dengue, como anticuerpos del paciente, ya sean IgM o IgG. En 1998, la casa comercial Panbio® (Australia) presentó una prueba rápida de casete que consiste en un sistema visual en tira reactiva, donde se detectan IgM e IgG, y diferencia presuntivamente una infección primaria de una secundaria. A partir de una reacción que es revelada por cromatografía,

en donde el suero en estudio migra a lo largo de la membrana de nitrocelulosa incorporada en el casete, se atrapan los anticuerpos IgG e IgM presentes en el suero por acción de anticuerpos anti-IgG o anti-IgM humana, y posteriormente se adhiere un antígeno viral unido a un anticuerpo monoclonal anti-virus dengue marcado con oro coloidal. Así, en un paciente en fase aguda de enfermedad, la presencia de IgG es característica de una infección secundaria y la presencia de IgM de una infección primaria. Además, estas pruebas contienen una línea de control “C” que siempre debe ser positiva, pues garantiza la calidad de los reactivos del casete e indica que se adicionó un volumen suficiente de la muestra. La sensibilidad y la especificidad de esta prueba es del 99% y del 96%, respectivamente [87-89].

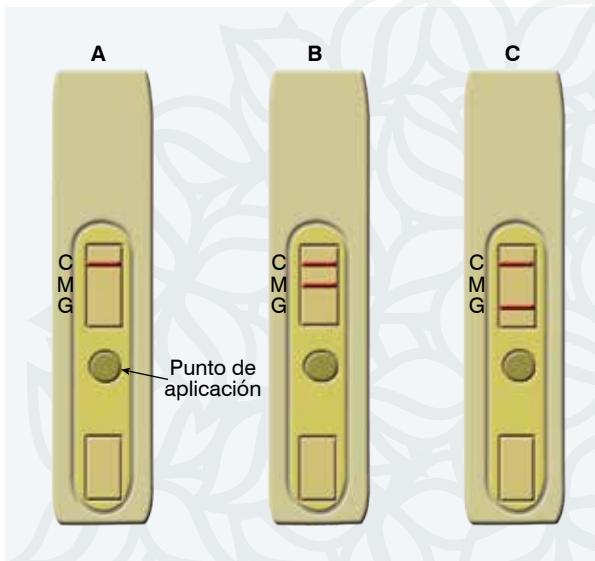


Figura 13. Prueba rápida de casete para el diagnóstico de dengue. **A.** Prueba negativa, el control es positivo. **B.** Prueba positiva, con detección de IgM. **C.** Prueba positiva, con detección de IgG. Convenciones: C, control positivo; M, Inmunoglobulina M; G, Inmunoglobulina G.

Otros investigadores han propuesto como prueba rápida para el diagnóstico de dengue la detección del antígeno viral NS1, el cual se secreta y participa en la formación de inmunocomplejos, y se puede detectar desde el primer día de aparición de los síntomas [17, 90]. La prueba rápida consiste en la detección rápida y temprana del antígeno por inmunocromatografía y también se detecta la presencia de anticuerpos IgM e IgG contra el virus. La sensibilidad de esta prueba está entre 62,4% y 80,7%, y tiene una especificidad entre 89,1% y 100%, respectivamente [91, 92]. En la figura 13 se esquematiza una prueba rápida para el diagnóstico de dengue.

En Colombia, se ha evaluado la utilidad de este tipo de pruebas en varios estudios [87, 91], los cuales resaltan la importancia de su uso en poblaciones rurales, dadas las limitantes que se tienen en campo para el adecuado almacenamiento y transporte de las muestras [87]. Los resultados obtenidos en estos estudios indican que tanto la sensibilidad como la especificidad de una de las pruebas rápidas para detección de IgM (casa comercial Panbio®) son superiores al 70%, mientras que para otra de las pruebas disponibles para detección de NS1/IgM/IgG (SD BIOLINE®), la sensibilidad es mayor al 80% cuando se compara contra pruebas de otras casas comerciales [87, 91]. En general, las pruebas rápidas son útiles como ayuda diagnóstica.

Tanto las pruebas de ELISA como las pruebas rápidas han tenido un gran auge en los últimos años, debido a sus altos niveles de confiabilidad y, en especial, a la disminución del tiempo para la obtención de los resultados; por estas razones, se hace pertinente incluir un listado de las pruebas comerciales que se utilizan con mayor frecuencia (ver tabla 1).

Prueba de neutralización por reducción del número de placas

La técnica de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) se considera la técnica de referencia para la detección de anticuerpos neutralizantes en pacientes que han

Tabla 1. Pruebas inmunológicas comerciales que se emplean con mayor frecuencia para el diagnóstico de dengue. Adaptado de Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. Rev Biomed. 2005; 16:113-37 [90]

Prueba	Casa comercial	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Dengue Duo Rapid Strip Test	PanBio	90	86
PanBio Dengue Screening ELISA	PanBio	95	94
Pan Bio Dengue Duo ELISA	PanBio	99-100	92,8
MRL Diagnostics Dengue Fever Virus IgM Capture ELISA	MRL Diagnostics	98	100
Pan Bio Rapid Immunochromatographic Test	PanBio	100	100

sufrido infección por el virus dengue. Además, es la prueba más específica para detectar anticuerpos contra cada serotipo viral y su principal utilidad es la evaluación de la protección ofrecida por los candidatos vacunales disponibles. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico temprano es poca, pues los anticuerpos de tipo neutralizante empiezan a aparecer a partir del día 10 después del inicio de los síntomas [93].

Para realizar esta técnica se necesita la estandarización previa de un método de titulación viral en una línea celular de mamífero; dicho método permite determinar las unidades formadoras de placa de una cepa viral en condiciones normales. Una vez se ha estandarizado este método, se determina la habilidad de los anticuerpos presentes en el suero del paciente para neutralizar o disminuir la formación de dichas placas, de manera que pueda determinarse el título de neutralización [93]. En muchos laboratorios se ha propuesto estandarizar esta metodología con la línea celular VERO, aunque se ha descrito el uso de otras líneas celulares, como BHK21 y LLCMK2. A pesar de que se ha intentado generar un consenso según los lineamientos de la OMS, estos procedimientos están limitados a la disponibilidad de las líneas celulares en los laboratorios y de los virus de referencia que se deben usar y, como se mencionó, a la existencia de un protocolo estandarizado de titulación viral [93, 94].

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares se han convertido en herramientas rápidas y confiables para el diagnóstico de las infecciones virales, ya que tienen mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas; además, permiten detectar la variabilidad genética del virus a partir de la secuenciación del genoma [6, 17, 54] y por ello, también sirven para estudios epidemiológicos. Entre las técnicas más usadas para la amplificación del genoma viral y que la OMS propone para el diagnóstico, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en los mecanismos celulares de replicación de los ácidos nucleicos; mediante esta técnica se amplifican secuencias virales únicas que se encuentran en las cepas circulantes [54, 95-97].

Hay diferentes tipos de PCR y para el caso de la identificación del genoma del virus dengue, desde la década de los años noventa se han realizado diversos ensayos que la han propuesto como una técnica diagnóstica rápida. Sin embargo, estudios recientes sugieren que para el diagnóstico de la infección por este virus, las técnicas de PCR no se encuentran unificadas en los laboratorios de referencia en el contexto internacional, ya que existen diferencias en la sensibilidad. Este hecho no sólo está relacionado con las características técnicas de la prueba, sino que también con el momento de la toma de muestra, ya que hay una relación inversamente proporcional entre la carga viral y los días de inicio de los síntomas [98, 99].

PCR con transcripción reversa

En los últimos años ha aumentado en el número de investigaciones en las que se usan métodos moleculares para confirmar el diagnóstico de los casos sospechosos de dengue. Las técnicas moleculares tienen varias ventajas con respecto a las celulares y serológicas; por ejemplo, son más sensibles y específicas, permiten la detección directa del virus y el resultado se obtiene en poco tiempo. Además, algunos autores resaltan la importancia que tiene a 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 [98, 100].

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 [101-104]. En general, la técnica RT-PCR consta de tres pasos:

1. Pre-PCR, extracción del ARN a partir de suero de pacientes.
2. Transcripción reversa (ARN a ADN), seguido de la PCR, que puede o no ser anidada.
3. Post-PCR, visualización en un gel. El “punto final” que permite definir si una muestra es o no positiva, es la visualización en el gel, obteniéndose un resultado netamente cualitativo.

En la figura 14 se presenta el esquema de una RT-PCR convencional.

En cuanto a las técnicas de extracción de ARN, éstas dependen principalmente del origen de la muestra y se deben seleccionar según su eficiencia, ya que el método empleado debe garantizar la obtención del material no sólo en buena cantidad si no libre de posibles contaminantes o inhibidores de los métodos analíticos que se usarán [105]. Entre las técnicas más utilizadas para la extracción de ARN viral en muestras de sangre se encuentran la extracción con QIAamp Viral RNA (Qiagen®), la técnica de extracción con RNazol [106] y la técnica con TRIzol (Invitrogen®). Aunque en muchas ocasiones se prefiere la extracción con estuche, las otras dos técnicas también resultan ser muy útiles, confiables y económicas. En conclusión, la selección final de la metodología se deberá ajustar a la asequibilidad, que en los países en vías de desarrollo, puede ser un factor decisivo [105, 107].

En 1992, Lanciotti y colaboradores propusieron una RT-PCR para la detección y tipificación del virus dengue, la cual consiste en la conversión inicial del ARN en ADN copia mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa; a partir del ADN obtenido se realiza una PCR convencional, para lo cual se usan cebadores (*primers*) que amplifican genes de las regiones C y prM del virus, seguida de una PCR anidada con cebadores específicos, capaces de reconocer cualquiera de los cuatro serotipos en ARN extraído de suero, de sobrenadantes de cultivos celulares o de mosquitos infectado. No obstante, esta técnica presenta algunas complicaciones relacionadas con la obtención de falsos positivos por la contaminación cruzada generada por los amplicones resultantes de la primera ronda de PCR y que son los que sirven de molde para la segunda ronda [103, 108, 109].

Inicialmente, esta amplificación se debía hacer por separado para cada serotipo, pero en la actualidad se puede usar una técnica *multiplex* para la identificación de los cuatro en una sola reacción. En 1998, Harris y colaboradores describieron un ensayo de RT-PCR *multiplex* en un solo tubo a partir de la modificación del ensayo propuesto por Lanciotti y colaboradores. Este nuevo ensayo consistía en la utilización de cinco pares de cebadores, que incluían un par hacia una región del gen de la cápside y otros cuatro cebadores serotipo-específicos. Este ensayo se ha utilizado en el estudio de varios brotes de dengue, como el de Bolivia en 1997, así como para descartar brotes por otros agentes etiológicos que se comportan parecido al dengue [110]. Más adelante, otros investigadores estandarizaron un protocolo basado en el de Harris y colaboradores, en el que el ensayo se realiza en un solo paso, sólo dura cuatro horas, un par reconoce a una región conservada en el virus dengue y se incluyen otros específicos de cada serotipo [111].

Los tipos de RT-PCR se han comparado con los métodos inmunológicos tradicionales y se ha observado que su especificidad es mayor, aun cuando los títulos del virus son bajos; por ello, a través de diversas investigaciones, se ha buscado incrementar su uso y hacerla más aplicable durante el diagnóstico. Adicionalmente, la RT-PCR representa una disminución en los costos, ya que permite evaluar la presencia de los cuatro serotipos en una sola reacción [112-116]. En la figura 15 se muestra un gel positivo para cada serotipo del virus dengue usando los cebadores reportados por Chien y colaboradores en 2006 [117].

RT-PCR en tiempo real

Como se mencionó, la detección del virus dengue por RT-PCR se usa desde hace más de dos décadas para el diagnóstico y la serotipificación. En años recientes, se ha descrito una técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), la cual permite serotipificar y cuantificar el virus, es decir, determinar la carga viral en el paciente [118, 119].

Las técnicas de PCR en tiempo real combinan 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 inversa, 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 [120]. En esta técnica se emplean cebadores específicos para cada serotipo del virus dengue y fluorocromos como

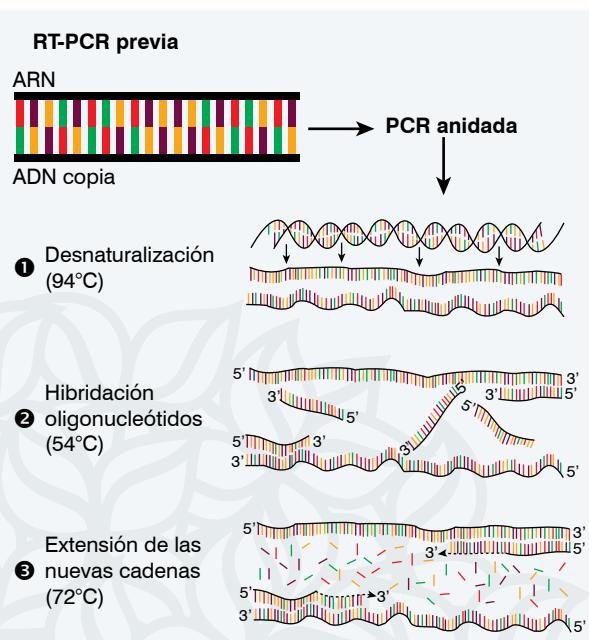


Figura 14. RT-PCR convencional para el diagnóstico de dengue. Esta técnica combina los pasos de una PCR convencional después de la obtención de un ADN copia por transcripción inversa. Se puede utilizar para identificar cada serotipo por separado o en forma múltiple.

el SYBR Green o sondas tipo TaqMan marcadas con fluorocromos [117], 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 [17]. Entre las ventajas que tiene la qRT-PCR se encuentran [40, 121, 122]:

- Disminución del tiempo, pues no necesita el paso post-PCR.
- Se puede seguir la reacción en tiempo real.
- No hay riesgo de contaminación post-PCR.
- Permite la cuantificación absoluta o relativa del ARN.
- Su sensibilidad y especificidad son superiores que las de la RT-PCR convencional.
- En el caso de la serotipificación, se puede realizar una “qRT-PCR multiplex”, es decir, en una sola muestra se pueden evaluar o detectar los cuatro serotipos y se obtiene una cuantificación relativa del título viral.
- Adicionalmente, como se ha postulado que la carga viral puede ser un factor determinante en la evolución de la enfermedad a formas severas, la técnica de qRT-PCR tendría no solo importancia para mejorar el diagnóstico de la infección, sino que permitiría establecer el pronóstico de la enfermedad.

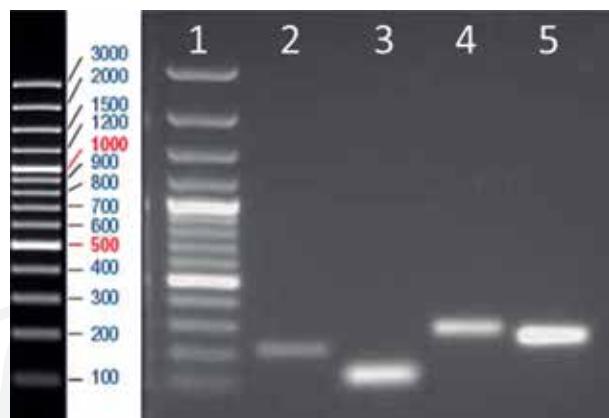


Figura 15. Detección de genoma viral en sobrenadantes de cultivos celulares infectados con el virus dengue extraído mediante el QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). En la RT-PCR se emplea la enzima retrotranscriptasa M-MLV de Promega. Se observa una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE1X teñido con Bromuro de etidio en el que se observa el resultado de una PCR *multiplex*, en la que cada muestra amplificó de manera específica para cada uno de los serotipos virales. **Carril 1:** Marcador de peso molecular. **Carril 2:** serotipo DENV-1, cepa de referencia West Pac 74 (208 pb). **Carril 3:** serotipo DENV-2, cepa de referencia S16803 (119 pb). **Carril 4:** serotipo DENV-3, cepa de referencia CH53489 (288 pb). **Carril 5:** serotipo DENV-4, cepa de referencia TVP360 (260 pb). Convenciones: pb, pares de bases. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

En la figura 16 se muestran los resultados de amplificación por qRT-PCR de las curvas estándar obtenidas para cada uno de los serotipos, generadas a partir de diluciones seriadas (1×10^8 a 1×10^4 copias genómicas) de constructos obtenidos al clonar un inserto correspondiente a la región C-prM específica de cada serotipo en el vector pGEM-T Easy (Promega®) [121]. Los cebadores para la amplificación habían sido reportados previamente [117]. Las curvas estándar obtenidas a partir del ADN plasmídico que contiene los insertos específicos de serotipo, cuyos sitios de unión al cebador son idénticos a los sitios de unión en la muestra problema, se utilizan para calcular la cantidad de copias genómicas en la misma al extrapolar los datos usando la ecuación de la recta obtenida de la curva de regresión lineal.

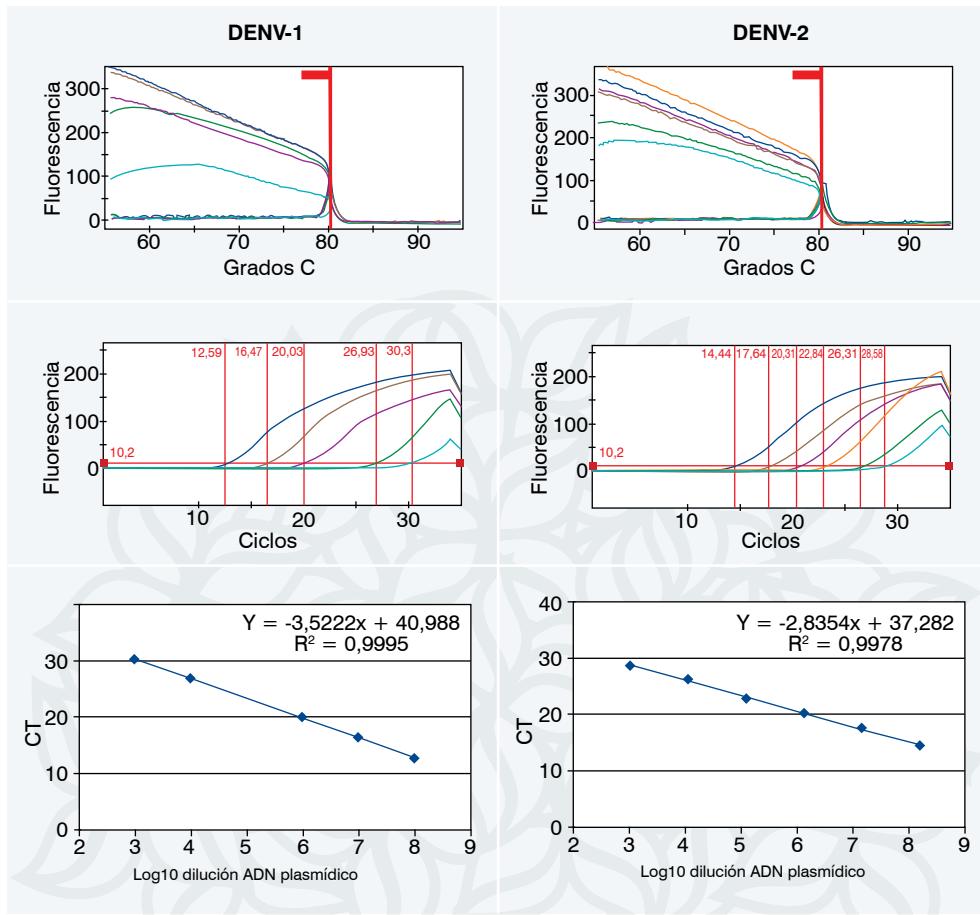


Figura 16. Curvas estándar para los serotipos DENV-1 y DENV-2 para ensayos de qRT-PCR usando SYBR Green (Fermentas®). En la parte superior se muestran las curvas de punto de fusión de ADN para los plásmidos que contienen insertos específicos para DENV-1 y DENV-2, en las cuales se observa un pico de fluorescencia bien definido para cada serotipo, lo que sugiere la especificidad de los cebadores. En la parte media se muestran las curvas estándar obtenidas a partir de diluciones seriadas (1×10^0 a 1×10^4 copias genómicas) para cada plásmido con el inserto específico de serotipo, en las que se puede observar cómo aumenta el número de ciclos que son necesarios para la detección de la fluorescencia, según va disminuyendo la concentración de la muestra. Finalmente, en la parte inferior se muestran las curvas de regresión lineal de logaritmo de la dilución del ADN plasmídico versus el Ct, con un coeficiente de correlación mayor de 0,99 ($r^2 > 0,99$) para cada plásmido que contiene el inserto específico de los serotipos DENV-1 y DENV-2. El Ct (threshold cycle) corresponde al número de los ciclos necesarios para que haya un aumento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal de base. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Conclusiones

El deterioro de la infraestructura de la salud pública, los cambios demográficos, el crecimiento de la población, las alteraciones ecológicas como la deforestación, los cambios climáticos, los movimientos internacionales de personas de una región a otra y el transporte de mercancías, son factores que han permitido la aparición de diferentes brotes y enfermedades virales, entre ellas el dengue [123, 124].

En Colombia, no existe un programa actual de vigilancia para arbovirus en las regiones costeras o selváticas, y la circulación de los serotipos del virus dengue no es notificada oportunamente por los organismos gubernamentales, debido principalmente a un manejo

inadecuado de los datos por parte de los funcionarios, quienes o no tienen una capacitación adecuada o con frecuencia son reemplazados; por tanto, no hay una continuidad en la transferencia de la información de un organismo a otro [52]. Para evitar los graves efectos de estas epidemias sobre las poblaciones, los países deberán darle un lugar prioritario en la agenda nacional a la vigilancia de enfermedades como el dengue, que afectan seriamente la salud pública y que desde hace varias décadas se ha evidenciado su reemergencia constante [125]. Teniendo en cuenta las prioridades mencionadas, es necesario recalcar que la investigación aplicada al diagnóstico rápido y al tratamiento es un medio a través del cual se podría realizar una intervención oportuna a este problema que afecta a la población colombiana.

Por otra parte, el diagnóstico definitivo de dengue involucra desde la detección de anticuerpos, antígenos o ARN viral, hasta el aislamiento viral; sin embargo, cada método varía en cuanto a la sensibilidad, la especificidad, los costos y el tiempo para obtener un diagnóstico final (ver **tabla 2**). Es así, como los análisis que se basan en la respuesta inmune frente a la infección se han convertido en técnicas rutinarias, debido a la rápida obtención de los resultados y al bajo costo; sin embargo, están sujetas al aumento del título de anticuerpos, lo cual dependerá del estado inmunológico del paciente, de la fase de la enfermedad en la que se toma la muestra y si se trata de una infección primaria o de una secundaria. Adicionalmente, la posibilidad de generar falsos positivos por reacciones cruzadas con virus genéticamente relacionados es alta.

Actualmente, la infección por el virus dengue es un evento importante en salud pública colombiana y para su diagnóstico se ha establecido principalmente las técnicas inmunológicas [126]. En Antioquia, la Dirección Seccional de Salud de Antioquia, en el protocolo de diagnóstico y notificación para dengue, establece la detección de anticuerpos IgM específicos y anticuerpos totales por inhibición de la hemaglutinación como las técnicas diagnósticas que se deben realizar en los centros de salud ante un caso sospechoso de dengue [127].

De acuerdo con lo revisado, es importante preguntarse si en realidad las técnicas que se han establecido por los organismos gubernamentales son las adecuadas para un diagnóstico acertado y oportuno, ya que la efectividad de dichas técnicas depende de diversos factores, como las infecciones repetidas por diferentes serotipos en las zonas altamente endémicas, donde la reactividad cruzada no solo por infecciones por el virus dengue, sino por otros Flavivirus, no permiten un diagnóstico acertado. Además, es importante resaltar que los signos clínicos y la sintomatología que presentan los pacientes no son suficientes para determinar la ausencia o la presencia de una infección por el virus dengue cuando en una prueba inmunológica se obtienen resultados negativos, por lo que es indispensable el uso de un segundo método, preferiblemente más sensible y específico, como lo son las técnicas moleculares. Lamentablemente, por costos, poca disponibilidad y falta de personal entrenado, en muchos casos no se realiza la confirmación del diagnóstico [54].

En los últimos años, las nuevas tecnologías han permitido el desarrollo de otras técnicas diagnósticas y de éstas, las moleculares son las de mayor auge y en las que se han enfocado muchas de las investigaciones, pues son las más específicas y rápidas para un diagnóstico definitivo. Estas técnicas no solo detectan el virus, sino que permiten una serotipificación durante la fase aguda de la enfermedad, sin importar la respuesta inmune en el hospedero o la reactividad cruzada. Por otro lado, se ha demostrado que existe una correlación del 88% entre las técnicas de aislamiento viral y la qRT-PCR [128]. Otra ventaja que ofrece la RT-PCR, es que se caracteriza por ser un método rápido, sensible y sencillo, aplicable en muestras

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por el virus dengue

Tipo de método	Técnicas	Ventajas	Desventajas
Indirecto	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibición de la hemaglutinación ▪ Fijación del complemento ▪ ELISA ▪ Mac-ELISA ▪ Pruebas rápidas: detección de anticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son útiles para la confirmación de infecciones agudas ▪ No son costosas ▪ Son fáciles de realizar ▪ Permiten diferenciar una infección primaria de una secundaria 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los títulos bajos de anticuerpos pueden ser no detectados, en especial de IgM en las infecciones secundarias ▪ Requieren sueros pareados, lo cual retarda el diagnóstico ▪ Si el paciente tiene una enfermedad que interfiere en la respuesta inmune, se dificulta el diagnóstico ▪ No son tan sensibles como las técnicas que detectan directamente el genoma o los antígenos
Directo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pruebas moleculares: RT-PCR convencional, RT-PCR <i>multiplex</i>, RT-PCR en tiempo real ▪ Aislamiento Viral: aislamiento en cultivos celulares, inoculación de mosquitos, inoculación de ratones ▪ Pruebas inmunológicas: inmunofluorescencia directa o indirecta 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Permiten el diagnóstico temprano, lo cual favorece un tratamiento rápido y adecuado ▪ Tienen alta especificidad, tanto para la detección del virus como para la serotipificación 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requieren de infraestructura y equipos altamente costosos, además de personal con experiencia ▪ No es posible diferenciar entre una infección primaria y una secundaria
Combinado	Pruebas rápidas: detección de NS1 y de anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sus costos son muy bajos ▪ Se pueden realizar a temperatura ambiente y no requieren de equipos especializados ▪ Permiten diferenciar entre infección primaria y secundaria ▪ La detección del antígeno NS1 se puede realizar desde el primer día de síntomas, aun cuando el título de anticuerpos sea muy bajo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aún falta estudios que incluyan el uso de éstas técnicas para evaluar su especificidad

clínicas humanas como biopsias y tejidos provenientes de autopsias, o incluso en mosquitos [54]; adicionalmente, esta técnica es aplicable tanto para el diagnóstico como para estudios epidemiológicos [63].

Actualmente, la OPS recomienda el uso de la técnica PCR de Lanciotti y colaboradores [103], o su variante de Harris y colaboradores [110] para el diagnóstico y detección del virus dengue; sin embargo, el desempeño de los pares de cebadores utilizados ha disminuido considerablemente, debido a que el genoma del virus dengue posee una ARN polimerasa dependiente de ARN que carece de actividad correctora, lo que genera una acumulación de cambios, y por ende, la desactualización de dichos cebadores, así como la disminución de la eficiencia en la amplificación del genoma de las cepas circulantes; por lo tanto, la actualización de los cebadores es importante para la correcta detección y serotipificación del virus [129-131].

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que estas técnicas moleculares requieren de equipos e infraestructura costosa y de personal altamente calificado para su aplicación, lo que reduce la posibilidad de que en muchas de las regiones colombianas que se tornan hiperendémicas

para dengue tengan acceso a ellas. Una alternativa en dichos casos es la utilización de pruebas rápidas, ya que son fáciles de almacenar y de procesar, y son muy sensibles y específicas, en especial cuando se detecta de manera combinada un antígeno viral (proteína NS1) y los anticuerpos contra el virus (IgM e IgG).

Por otro lado, el aislamiento viral, considerado como la técnica más confiable y a través de la cual se realiza un diagnóstico directo, es una técnica que requiere demasiado tiempo para definir el diagnóstico (varios días, incluso semanas), tiene múltiples requisitos de infraestructura y altos costos para el mantenimiento de líneas celulares e insectarios, por lo que se convierte en una técnica poco útil para proporcionar un diagnóstico rápido y oportuno, principalmente en los casos correspondientes a dengue complicado.

En conclusión, aunque las técnicas inmunológicas como el ELISA son las más accesibles, las de mayor confianza son aquellas que permitan detectar el genoma (RT-PCR), los antígenos (pruebas rápidas) o la partícula viral completa (aislamiento viral), como se muestra en la figura 17. A pesar de la gran variedad de técnicas disponibles, no se puede concluir que haya una recomendada para todos los casos; sin embargo, sí se hace necesario disponer de pruebas para la detección del virus dengue que cada vez sean más sensibles y específicas, y como lo han indicado recientes estudios que evalúan diferentes alternativas inmunológicas, el uso combinado de pruebas que detecten antígenos virales junto con anticuerpos específicos tipo IgM pueden ser las técnicas de elección para diagnósticos rápidos. No obstante, es de importancia incluir algunas técnicas moleculares como opción de diagnóstico en aquellos casos donde la respuesta inmunológica del paciente no permita una detección serológica del virus.

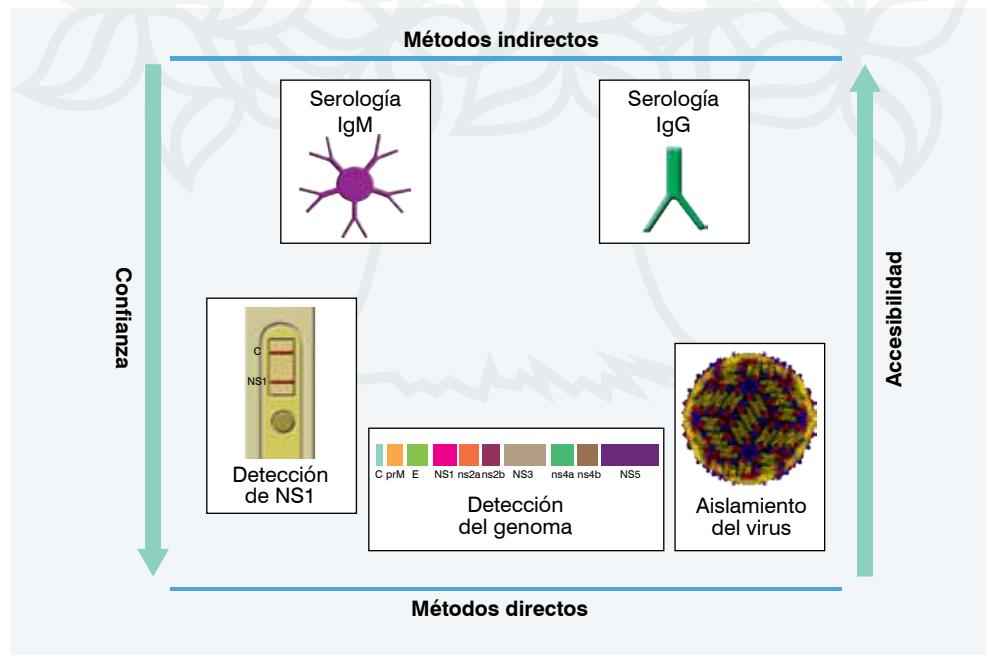


Figura 17. Comparación de las técnicas de diagnóstico directo e indirecto en relación a su confianza y accesibilidad. Aunque las técnicas inmunológicas como el ELISA son las más accesibles, las de mayor confianza son aquellas que permitan detectar genoma (RT-PCR), antígenos (pruebas rápidas) o partícula viral completa (aislamiento viral).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Investigación- COLCIENCIAS. Proyectos 111549326092 y 111549326083. Los autores agradecen a Liliana Gutiérrez Ruiz, estudiante de Comunicación gráfica publicitaria, por su ayuda en el diseño de los esquemas.

Bibliografía

1. Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol* 2001; 11: 301-311.
2. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644-1652.
3. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 2004; 10: S98-109.
4. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002; 33: 330-342.
5. Farrar J, Focks D, Gubler D, Barrera R, Guzman MG, Simmons C, et al. Towards a global dengue research agenda. *Trop Med Int Health* 2007; 12: 695-659.
6. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 2004; 8: 69-80.
7. Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol* 1994; 145: 93-104.
8. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue. 2006. http://www.who.int/tdr/publications/documents/swg_dengue_2.pdf Consultado en junio de 2012.
9. Working Group on Dengue Research, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Buchy P, Yoksan S, Peeling RW, Hunsperger E. Laboratory tests for The diagnosis of dengue virus infection. 2006. http://www.tropika.net/review/061001-Dengue_Diagnosis/article.pdf Consultado en junio de 2012.
10. Teles FR, Prazeres DM, Lima-Filho JL. Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol* 2005; 15: 287-302.
11. Vandegrift KJ, Wale N, Epstein JH. An ecological and conservation perspective on advances in the applied virology of zoonoses. *Viruses* 2011; 3: 379-397.
12. Nichol ST, Arikawa J, Kawaoka Y. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12411-12412.
13. Cusi MG. Editorial: arthropod-borne viruses and emergent viruses. *Open Virol J* 2010; 4: 7.
14. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-993.
15. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e646.
16. Quintero-Gil DC, Osorio-Benítez JE, Martínez-Gutiérrez M. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia* 2010; 23: 137-145.
17. Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales, Organización Mundial de la Salud. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2009. <http://new.paho.org/hq/dm/documents/2011/ndeng31570.pdf> Consultado en junio de 2012.
18. Pan American Health Organization, World Health Organization. Epidemiological alert: dengue. 2012. http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=17246&Itemid=1091 Consultado en junio de 2012.
19. República de Colombia, Instituto Nacional de Salud, Sistema de Vigilancia en Salud Pública-SIVIGILA, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 52 de 2011 (25 al 31 de diciembre de 2011). 2011 <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=93475#> Consultado en julio de 2012.
20. República de Colombia, Instituto Nacional de Salud, Sistema de Vigilancia en Salud Pública-SIVIGILA, Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 21 de 2012 (20 al 26 de Mayo de 2012). 2012. <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=96134#> Consultado en mayo de 2012.
21. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang YP, Watowich SJ. Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. *Antiviral Res* 2009; 82: 110-114.
22. Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol* 2005; 79: 8303-8315.
23. Martínez-Gutierrez M. Antiviral activity of lovastatin against dengue virus: evaluation in vitro

- and in vivo. [Tesis Doctoral]. Medellín, Universidad de Antioquia; 2010.
24. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of virus dengue replication. Future Microbiol 2008; 3: 155-165.
 25. del Angel RM. Entrada del virus del dengue: moléculas que pueden modular la patogenia viral. Cinestav 2006; 25: 38-43.
 26. Martin NC, Pardo J, Simmons M, Tjaden JA, Widjaja S, Marovich MA, et al. An immunocytometric assay based on dengue infection via DC-SIGN permits rapid measurement of anti-dengue neutralizing antibodies. J Virol Methods 2006; 134: 74-85.
 27. Tassaneetrithip B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumppheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. J Exp Med 2003; 197: 823-829.
 28. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. J Gen Virol 2008; 89: 474-484.
 29. Chua JJ, Ng MM, Chow VT. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. Virus Res 2004 102: 151-163.
 30. Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. FEBS J 2007; 274: 2986-3002.
 31. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol 2006; 80: 11418-11431.
 32. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol 1990; 44: 649-688.
 33. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology (ed 5th). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 34. Uchil PD, Satchidanandam V. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. J Biol Chem 2003; 278: 24388-24398.
 35. Gomez-Dantes H, Willoquet JR. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. Cad Saude Publica 2009; 25 Suppl 1: S19-31.
 36. Pawitan JA. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. Acta Med Indones 2011; 43: 129-135.
 37. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. J Virol 2005; 79: 853-859.
 38. Watts DM, Porter KR, Putvatana R, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. Lancet 1999; 354: 1431-1434.
 39. Armstrong PM, Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg 2003; 68: 539-544.
 40. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J Infect Dis 2000; 181: 2-9.
 41. Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquivel DR, Jimenez RE. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. Trop Med Int Health 2009; 14: 1241-1250.
 42. Guzman MG, Garcia G, Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Rev Panam Salud Pública 2006; 19: 204-215.
 43. Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Munoz-Jordan JL, Pybus OG, et al. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. Mol Biol Evol 2010; 27: 811-818.
 44. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. Yale J Biol Med 1970; 42: 350-362.
 45. Costa CA, Santos IG, Barbosa Mda G. [Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas]. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 677-681.
 46. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue. Laboratory guidance and diagnostic testing. 2010. <http://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>. Consultado en julio de 2010.
 47. Potts JA, Rothman AL. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. Trop Med Int Health 2008; 13: 1328-1340.
 48. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social. Minprotección solicita implementar medidas para prevenir dengue. Boletín de Prensa: No 030. 2008. <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=17256&IDCompany=3>.
 49. Ocazionez RE, Cortés FM, A. VL. Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. Colomb Med 2005; 36: 65-72.
 50. Martinez RA, Diaz FA, Villar LA. Evaluación de la definición clínica de dengue sugerida por la Organización Mundial de la Salud. Biomedica 2005; 25: 412-416.
 51. Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, de Oliveira LL, De Paula SO. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications. J Glob Infect Dis 2009; 1: 38-44.
 52. Zea D, Osorio L. Situación del sistema de vigilancia de casos de Dengue en un municipio de Colombia. Rev Salud Pública 2011; 13: 785-795.

53. Guzmán MG, Kourí G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 621-627.
54. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 390-398.
55. Champell WA, Calisher C.H. TRF. Comparison of three methods used to isolate dengue virus type 2. *Appl Microbiol* 1971; 22: 1100-1103.
56. Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg* 1979 28: 1053-1059.
57. Ocazionez RE, Gómez SY, Cortés FM. Serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica colombiana. *Rev Salud Pública* 2007; 9: 262-274.
58. Igarashi A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 1978; 40: 531-544.
59. Quintero-Gil DC, Arbelaez-García L, Ospina M, Martínez-Gutierrez M. La replicación diferencial del Virus Dengue en células de mosquito y mamífero es dependiente del serotipo infectante. *Infectio* 2012; 16: 38.
60. Roche RR, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3508-3510.
61. Quintero-Gil DC, Martínez-Gutierrez M, Ospina M, Díaz F, Osorio J. Diferencias en la capacidad replicativa in vitro de los serotipos 2 y 3 de Virus Dengue provenientes de aislados clínicos. *Infectio* 2010; 14: 37.
62. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Kurane I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J Clin Virol* 2002; 24: 203-209.
63. Philip-Samuel P, Tyagi BK. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J Med Res* 2006; 123: 615-628.
64. Singh KR, Paul SD. Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures. *Bull World Health Organ* 1969; 40: 982-983.
65. Baumgarten A. Viral immunodiagnosis. *Yale J Biol Med* 1980; 53: 71-83.
66. Cornesky RA, Hammon WM, Atchison RW, Sather GE. Effect of urea on the hemagglutinating and complement-fixing antigens of type 2 Dengue virus. *Infect Immun* 1972; 6: 952-957.
67. Martínez-Vega RA, Díaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA. Dificultad para el diagnóstico clínico temprano del dengue en un área endémica y su impacto sobre el manejo médico inicial. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 1153-1160.
68. Sa-Ngasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakij S, Pattanakul K, et al. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme linked immunosorbent assay. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 820-825.
69. Grist NR, Bell EJ, Follett EAC, Urquhart GED. Diagnostic Methods in Clinical Virology (ed 3rd). Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1979.
70. James K. Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 132-152.
71. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7: 561-573.
72. Khai-Ming C, Thain S, Thaung U, Tin U, Myint KS, Swe T, et al. Clinical and laboratory studies on haemorrhagic fever in Burma, 1970-72. *Bull World Health Organ* 1974; 51: 227-235.
73. Vesenjak-Hirjan J, Hermon Y, Vitarana T. Arbovirus infections in Ceylon. *Bull World Health Organ* 1969; 41: 243-249.
74. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico del dengue. 2002. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/manual-procedimientos-tecnicos.pdf> Consultado en junio de 2012.
75. Casals J, Brown LV. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J Exp Med* 1954; 99: 429-449.
76. Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Prakrong S, Chanama S, Sa-Ngasang A, Sawanpanyalert P, et al. Dengue virus cross-reactive hemagglutination inhibition antibody responses in patients with primary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 267-270.
77. Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Yabe S, Kurane I. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 725-728.
78. McBride WJ, Mullner H, LaBrooy JT, Wronski I. The 1993 dengue 2 epidemic in North Queensland: a serosurvey and comparison of hemagglutination inhibition with an ELISA. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 457-461.
79. Pavri KM, Ghosh SN. Complement-fixation tests for simultaneous isolation and identification of Dengue viruses, using tissue cultures. *Bull World Health Organ* 1969; 40: 984-986.
80. Rao TR. Immunological surveys of arbovirus infections in South-East Asia, with special reference to dengue, chikungunya, and Kyasanur Forest disease. *Bull World Health Organ* 1971; 44: 585-591.
81. Hongbao M, Kuan-Jiunn S, Sheau-Long L. Study of ELISA Technique. *Nature and Science* 2006; 4: 36-37.
82. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005; 51: 2415-2418.

83. Dittmar D, Cleary TJ, Castro A. Immunoglobulin G- and M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 498-502.
84. Blacksell SD, Bell D, Kelley J, Mammen MP, Jr., Gibbons RV, Jarman RG, et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1458-1464.
85. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Nguyen MD, Kneen R, et al. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 693-698.
86. Guzmán MG, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop* 2002; 54: 180-188.
87. Martínez-Vega RA, Diaz-Quijano FA, Coronel-Ruiz C, Yebraíl Gomez S, Villar-Centeno LA. Evaluación de la utilidad de la prueba rápida de cassette por inmunoensayo para el diagnóstico de dengue en una región endémica colombiana. *Biomédica* 2009; 29: 616-624.
88. Palmer CJ, King SD, Cuadrado RR, Perez E, Baum M, Ager AL. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio Rapid Immunochromatographic Test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1600-1601.
89. Sang CT, Hoon LS, Cuzzubbo A, Devine P. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of Dengue Virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 407-409.
90. Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed* 2005; 16: 113-137.
91. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology* 2010; 7: 361.
92. Tricou V, Vu HT, Quynh NV, Nguyen CV, Tran HT, Farrar J, et al. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BioMed Central* 2010; 10: 142.
93. Álvarez-Vera M, González-Rodríguez A, Díaz-Morejón D, Morier-Díaz L, Guzmán-Tirado MG. Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Rev Cubana Med Trop* 2010; 62: 138-145.
94. Sosa-Cabrera TJ, Santos-Perez M. Caracterización clínica y de laboratorio de un brote de dengue en un área rural de Campeche, México. *Rev Cubana Med Trop* 2008; 60: 136-140.
95. Cortés FM, Gómez SY, Ocazionez RE. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59.
96. Haras D, Amorós JP. [Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]. *Sante* 1994; 4: 43-52.
97. Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2107-2110.
98. 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 Negl Trop Dis* 2010; 4.
99. Yong YK, Thayan R, Chong HT, Tan CT, Sekaran SD. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med J* 2007; 48: 662-668.
100. 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 Barranquilla (Col)* 2012; 28: 1-15.
101. Grobusch MP, Niedrig M, Gobels K, Klipstein-Grobusch K, Teichmann D. Evaluation of the use of RT-PCR for the early diagnosis of dengue fever. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 395-397.
102. Gunsekera MB, Hapugoda MD, Gunasena S, Subasinghe SA, Bandara KB, Khan BK, et al. A novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction based-liquid hybridisation (RT-PCR-LH) assay for early diagnosis of dengue infection. *Ceylon Med J* 2003; 48: 17-22.
103. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-551.
104. Yamada K, Nawa M, Takasaki T, Yabe S, Kurane I. Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 150-155.
105. De Paula SO, Nunes C, Matos R, de Oliveira ZM, Lima DM, da Fonseca BA. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001; 98: 119-125.
106. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
107. Dettogni RS, Louro ID. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 4979-4983.
108. Maneekarn N, Morita K, Tanaka M, Igarashi A, Usawattanakul W, Sirisanthana V, et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 41-47.

109. Yenchitsomanus PT, Sricharoen P, Jaruthasana I, Pattanakitsakul SN, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, et al. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996; 27: 228-236.
110. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2634-2639.
111. Saxena P, Dash PK, Santhosh SR, Shrivastava A, Parida M, Rao PL. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virol J* 2008; 5: 20.
112. Al-Shanti N, Saini A, Stewart CE. Two-Step versus One-Step RNA-to-CT 2-Step and One-Step RNA-to-CT 1-Step: validity, sensitivity, and efficiency. *J Biomol Tech* 2009; 20: 172-179.
113. Hidalgo Ashrafi E, Yee J, Paul N. Selective control of primer usage in multiplex one-step reverse transcription PCR. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 113.
114. Lindegren G, Vene S, Lundkvist A, Falk KI. Optimized diagnosis of acute dengue fever in Swedish travelers by a combination of reverse transcription-PCR and immunoglobulin M detection. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2850-2855.
115. Sa-ngasang A, Wibulwattanakij S, Chanama S, O-rapipatipat A, A-nuegoonpit A, Anantapreecha S, et al. Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 205-209.
116. Suslov O, Steindler DA. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e181.
117. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1295-1304.
118. Drosten C, Göttig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2323-2330.
119. Wang WK, Sung TL, Tsai YC, Kao CL, Chang SM, King CC. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4472-4478.
120. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 365-379.
121. Quintero-Gil DC, Arbelaez-García L, Villar LA, Martínez-Gutiérrez M. Cuantificación por PCR en tiempo real de la carga viral en pacientes infectados con Virus Dengue. *Infectio* 2010; 14: 37.
122. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2408-2416.
123. Barrett R, Kuzawa CW, McDade T, Armelagos GJ. Emerging and re-emerging infectious diseases: the third epidemiologic transition. *Annu Rev Anthropol* 1998; 27: 247-271.
124. Morse SS. Emerging viruses: defining the rules for viral traffic. *Perspect Biol Med* 1991; 34: 387-409.
125. Mesa G, Rodríguez I, Teja J. Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública* 2004; 15: 285-287.
126. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Guía de atención clínica integral del paciente con dengue. 2010 http://new.paho.org/COL/index.php?option=com_content&view=article&id=773:guia-de-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-dengue&catid=686&Itemid=361 Consultado en junio de 2012.
127. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social, Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Protocolo de vigilancia epidemiológica para dengue. 2011. <http://www.dssa.gov.co/index.php/salud-publica/protocolos> Consultado en junio de 2012.
128. Lai YL, Chung YK, Tan HC, Yap HF, Yap G, Ooi EE, et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 935-941.
129. Usme-Ciro JA, Mendez JA, Tenorio A, Rey GJ, Domingo C, Gallego-Gómez JC. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virol J* 2008; 5: 101.
130. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol J* 2010; 7: 226.
131. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 1992; 122: 281-288.