

**FILODINÁMICA DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 EN EL ÁREA
METROPOLITANA DE BUCARAMANGA, SANTANDER DURANTE EL
PERIODO 2001 A 2010.**

LUZ AIDA REY CARO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2016**

**FILODINÁMICA DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 EN EL ÁREA
METROPOLITANA DE BUCARAMANGA, SANTANDER DURANTE EL
PERIODO 2001 A 2010.**

LUZ AIDA REY CARO

Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora:

MSc, PhD. RAQUEL ELVIRA OCAZONEZ

Co-Director:

MD, MSc. LUIS ÁNGEL VILLAR CENTENO

Asesores:

MD, PhD. Francisco Javier Díaz

MD, PhD. Víctor Mauricio Herrera

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2016**

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso dado. Por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por poner en mi camino a todas aquellas personas que fueron soporte y compañía durante este proceso.

A mis padres

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Por siempre estar dispuestos a dar todo para que yo pueda lograr mis sueños.

A mi esposo

Por su paciencia, comprensión y motivación. Por sacrificar su tiempo para que yo pudiera cumplir mi objetivo. Por estar siempre a mi lado.

A mi hijo

Por ser mi motor de vida. Por iluminar mis días con su hermosa y tierna sonrisa.

A mis amigos

Por su compañía y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la doctora Raquel Ocazonez y el doctor Luis Ángel Villar que como orientadores de este trabajo contribuyeron enormemente en mi formación profesional, ética y científica.

A los doctores Francisco Javier Díaz y Víctor Mauricio Herrera por su valiosa asesoría.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales y el Grupo de Epidemiología Clínica.

A todos mis compañeros del Cintrop y CIE especialmente a María Fernanda, Cinthy, Aura, Isis, Lina, Anyela y Margarita por su apoyo, colaboración y compañía a lo largo del proceso.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MARCO DE REFERENCIA.....	26
5.1 DIVERSIDAD GENÉTICA DE DENV	26
5.2 DENV-3 DE COLOMBIA.....	29
5.3 PAPEL DEL VIRUS EN LA OCURRENCIA DE EPIDEMIAS	31
5.4 FACTORES ASOCIADOS A CAMBIOS DE ABUNDANCIA DE DENV	34
6. DISEÑO METODOLÓGICOS.....	37
6.1 DISEÑO.....	37
6.2 ABUNDANCIA DE DENV-3 RELATIVA A LOS OTROS SEROTIPOS DEL VIRUS: 2009-2010.	38
6.3 ESTUDIO GENETICO DE DENV-3.....	40
6.4 TIPO DE INFECCION PERIODO 2007-2010.	49
6.5 ANALISIS DE DATOS.	50
6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
7. RESULTADOS.....	57

7.1 ABUNDANCIA DE DENV-3 RELATIVA A LOS OTROS SEROTIPOS EN EL AMB. ...	57
7.2 RELACION ENTRE EL PATRÓN EPIDEMIOLÓGICO DEL DENGUE Y DENV-3 / CO- CIRCULACION DE SEROTIPOS.	61
7.3 RELACION ENTRE PRESENCIA DE DENV-3 Y FRECUENCIA DE INFECCION PRIMARIA Y SECUNDARIA	64
7.4 DIVERSIDAD GENÉTICA DE DENV-3.....	66
8. DISCUSION.....	71
9. CONCLUSIONES.....	78
10. FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	79
11. DEBILIDADES DEL ESTUDIO.....	80
12. RECOMENDACIONES.....	81
13. DIVULGACION Y FUENTES DE FINANCIACION	82
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	92

LISTADO DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Distribución temporal de los sueros para aislamiento viral.....	38
Tabla 2. Primers para amplificación y secuenciación del gen E de DENV-3	42
Tabla 3. Cepas de DENV-3 de donde se obtuvo la secuencia del gen E en el presente estudio.....	43
Tabla 4. Secuencias del gen E de DENV-3 de Santander obtenidas del banco de genes.	44
Tabla 5. Secuencias del gen E de DENV-3 de otros departamentos de Colombia obtenidas del GenBank.....	45
Tabla 6. Secuencias del gen E de DENV-3 de países de América y Asia obtenidas del GenBank.	46
Tabla 7. Relación de proyectos fuente de información secundaria para el estudio.	51
Tabla 8. Datos de incidencia del dengue en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander usados en este estudio.	52
Tabla 9. Distribución temporal de las cepas aisladas periodo 2009-2010	57
Tabla 10. Datos sobre distribución temporal de serotipos de DENV en Santander usados para análisis en este estudio.	59
Tabla 11. Correlación entre abundancia relativa de los serotipos del DENV para el periodo 2000-2010 evaluada de manera concurrente.	60
Tabla 12. Correlación entre abundancia relativa de los serotipos del DENV en cada año comparado con el inmediatamente posterior, para el periodo 2000-2010.	61

Tabla 13. Razón de tasas de incidencia (RTI) de dengue por índice Shannon durante los años 2000-2010.	63
Tabla 14. Frecuencia de infección primaria y secundaria en las muestras del periodo 2007-2010 procesadas en el presente trabajo.....	64
Tabla 15. Asociación entre serotipos y tipo de infección para el total de muestras evaluadas entre 2000-2010.....	66
Tabla 16. Asociación entre serotipo del DENV y tipo infección (primaria versus secundaria) durante los años 2000-2010.....	66

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Genoma y proteínas virales.	26
Figura 2. Árbol filogenético por Maximum likelihood del gen E de una muestra global de 50 secuencias de DENV-3.	28
Figura 3. Epidemias de dengue en Colombia, 1978-2010.	30
Figura 4. Evolución del dengue en las Américas, 1980–2010.	33
Figura 5. Evidencia de aislamiento primario de DENV en el estudio.	57
Figura 6. Evidencia de resultados de serotipificación de cepas de DENV aisladas en el estudio.	58
Figura 7. Abundancia del DENV-3 relativa a los otros serotipos en el departamento de Santander, 2000-2010.	59
Figura 8. Relación temporal entre el índice Shannon e incidencia de dengue durante los años 2000-2010.	64
Figura 9. Relación entre abundancia relativa del DENV3 y el tipo de infección durante los años 2000-2010.	65
Figura 10. Árbol consenso por mayoría de las secuencias de DENV-3 estimado por inferencia bayesiana con el programa MrBayes v3.2.5.	69
Figura 11. Diversidad genética de la población viral del DENV-3 que circulo en Santander durante los años 2001-2010.	70

RESUMEN

TÍTULO: FILODINÁMICA DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 3 EN EL ÁREA METROPOLITANA DE BUCARAMANGA, SANTANDER DURANTE EL PERIODO 2001 A 2010¹

AUTOR: LUZ AIDA REY CARO²

PALABRAS CLAVE: dengue, virus Dengue, serotipos, abundancia relativa, genotipo, diversidad genética, tipo de infección.

Introducción: En Santander el dengue es problema prioritario. 70% de casos se concentran en el área metropolitana. Estudiar la dinámica de DENV-3 y factores asociados ayudaría a entender la epidemiología del dengue.

Objetivo: Estudiar la relación entre factores del individuo y la población viral que contribuyen al mantenimiento del DENV-3 en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander.

Metodología: 208 sueros de pacientes con dengue se evaluaron por aislamiento viral para establecer abundancia de serotipos. Relaciones filogenéticas y diversidad genética relativa del DENV-3 de Santander se estudió en 50 secuencias del gen E completo. Tipo de infección se determinó en 254 sueros por ELISA-IgG captura. Se calculó el índice Shannon (IS) para determinar diversidad de serotipos en el tiempo. La correlación entre variables se evaluó mediante coeficiente de correlación de Spearman. Se modelaron razones de incidencia con regresión de Poisson.

Resultados: Los cuatro serotipos de DENV co-circularon. DENV-3 fue predominante en el periodo (45%). No se encontró correlación entre abundancia de DENV-3 y abundancia de otros serotipos. El predominio superior al 50% de DENV-3 se correlacionó con incremento en incidencia de casos y primoinfecciones en el AMB. No obstante, no se encontró asociación entre serotipo y tipo de infección. Todas las cepas de DENV-3 de Santander agruparon en el genotipo III observándose co-circulación de dos linajes del genotipo desde 2007. Cambios en la diversidad relativa de DENV-3 coincidió con introducción o remplazo de linajes y cambios en su abundancia. Se observó relación de proporcionalidad directa entre IS e incidencia de dengue evaluados concurrentemente (incremento de 6.3% en incidencia por 0.1 unidades; IC95%: 6.1–6.7), que se acentuó con el IS del año inmediatamente anterior (RDI: 8.4, IC95%: 8.1-8.7).

Conclusión: Los resultados revelan correlación temporal entre la dinámica de serotipos circulantes e incidencia del dengue, hallazgo potencialmente útil para modelos de predicción de epidemias en la región.

¹ Proyecto de grado

² Facultad de Salud. Departamento de Ciencia Básicas. Directora: Raquel Elvira Ocazonez. Co-Director: Luis Ángel Villar Centeno.

ABSTRACT

TITLE: PHYLODINAMIC OF DENGUE VIRUS SEROTYPE 3 IN THE METROPOLITAN AREA OF BUCARAMANGA, SANTANDER DURING THE PERIOD 2001 TO 2010³

AUTHOR: LUZ AIDA REY CARO⁴

KEYWORDS: dengue, Dengue virus serotypes, relative abundance, genotype, genetic diversity, type of infection.

Introduction: dengue is a priority problem in Santander. 70% of cases are concentrated in the metropolitan area. Study the dynamics of circulation of DENV-3 and associated factors would help to understand dengue epidemiology.

Objective: To study the relationship between individual factors and the viral population that contributes to the maintenance of DENV-3 in the metropolitan area of Bucaramanga, Santander.

Methods: 208 sera from patients with dengue were evaluated by virus isolation to establish serotype abundance. Phylogenetic relationships and genetic diversity on the DENV-3 was studied in 50 E complete gene sequences of Santander. Type of infection was determined in 254 sera by IgG capture ELISA. Shannon index (SI) was calculated to determine diversity of serotypes over time. The correlation between variables was evaluated using Spearman's rank correlation coefficient. Incidence ratios were modeled with Poisson regression.

Results: The four serotypes of DENV co-circulated. DENV-3 was predominant in the period (45%). No correlation between abundance of DENV-3 and abundance of other serotypes was found. Predominance higher to 50% of DENV-3 was correlated with increased of incidence and primary infections in the AMB. However, no association between serotype and type of infection was found. All strains of DENV-3 from Santander evaluated grouped in genotype III with co-circulation of two lineages of genotype since 2007. Changes in the relative diversity of DENV-3 coincided with introduction or replacement of lines and changes in serotype abundance. Direct proportionality relationship between IS and dengue incidence evaluated concurrently was observed (6.3% increase in incidence by 0.1 units, 95% CI 6.1-6.7), this relationship was accentuated with the IS of the previous year (RDI: 8.4, 95%: 8.1-8.7).

Conclusion: The results reveal temporal correlation between the dynamics of circulating serotypes and dengue incidence. This find would be potentially useful to predictive models of dengue epidemics in the region.

³ Project Degree

⁴ Faculty of Health. Department of Basic Science. Director: Raquel Elvira Ocazonez. Co-Director: Luis Ángel Villar Centeno.

INTRODUCCIÓN

El dengue es la enfermedad transmitida por un mosquito de mayor importancia en el mundo en términos de incidencia, morbilidad, e impacto económico. Su transmisión ha sido informada en más de 100 países en donde alrededor de 3 mil millones de personas se encuentran a riesgo de contraer la infección y se presume que anualmente 50 millones se infectan (Gubler & Meltzer 1999; Gubler 1998). En América el 70% de los casos de dengue se atribuyen a 4 países, siendo Colombia uno de ellos (Guzman et al. 2010; San Martín et al. 2010; Pan American Health Organization 2010). La enfermedad en el país representa un problema de salud pública en cerca de 700 municipios (80% del territorio), dentro de los que se encuentran los cuatro municipios que conforman el Área Metropolitana de Bucaramanga (AMB), Santander, área que constituye una de las regiones de mayor endemia del país y donde se concentraron el 73% de los casos de dengue reportados en el departamento durante el periodo 2000-2010 (79.176 casos) (Padilla et al. 2012). Durante este periodo la Secretaría de Salud del Departamento reportó epidemia de dengue en 2001–2002 y 2009-2010 con 18.202 y 29.367 casos, respectivamente (Ocazonez-jiménez et al. 2013).

El dengue es causado por el virus del mismo nombre, Virus Dengue (DENV). La enfermedad tiene un amplio espectro en su presentación clínica y evolución impredecible, abarcando desde el desarrollo de un cuadro febril indiferenciado (dengue leve), hasta formas potencialmente fatales que se acompañan de sangrado mayor e hipotensión (dengue grave) (Organizacion Mundial de la Salud & Organizacion Panamericana de la Salud 2009). Existen cuatro serotipos del virus Dengue (DENV-1 – 4). Cada serotipo es una colección de cepas virales antigénicamente similares pero heterogénea desde el punto de vista genético; dichas cepas han sido agrupadas en varios (3 a 6) genotipos usando análisis filogenéticos, los cuales presentan una distribución parcialmente segregada por

continente y por ciclo ecológico urbano o selvático. Por análisis evolutivos de la secuencia completa del gen E se ha establecido que DENV lleva al menos 1500 años circulando en la naturaleza. DENV-3 es más cercano a DENV-1 del cual se separó hace aproximadamente 100 años y es el único para el cual no se ha aislado cepas selváticas, aunque la presencia de anticuerpos neutralizantes en monos del sureste asiático sugiere que tiene un ciclo selvático similar al de los otros serotipos. (Holmes & Twiddy 2003).

Epidemias por dengue ocurren en América cada 3 a 5 años, y varían en la proporción de casos graves (San Martín et al. 2010; Brathwaite Dick et al. 2012). La ocurrencia de epidemias de dengue se debe a múltiples factores siendo los de mayor peso el incremento de la infestación por el mosquito (*Aedes aegypti*), el número de individuos susceptibles y la población viral circulante (San Martín et al. 2010; Brathwaite Dick et al. 2012). Con respecto al virus, se ha visto que la ocurrencia de una epidemia en áreas de baja endemicidad ha coincidido con introducción de un serotipo nuevo, re-introducción de un serotipo ausente por varios años e introducción de otro genotipo del serotipo (Guzmán et al. 1996; Gómez et al. 2008; Kouri et al. 1986; Klungthong et al. 2004; Dash et al. 2006). En áreas hiperendémicas, es decir donde co-circulan múltiples serotipos, el papel del virus es más complejo y por lo mismo difícil de precisar. No obstante, existen evidencias de que el cambio en el serotipo más abundante en una localidad es concomitante con ocurrencia de brote o epidemia (Ocazonez et al. 2006; Montoya et al. 2013).

El cambio en la abundancia de los serotipos ha sido relacionado principalmente con dos factores: la diversidad genética de la población viral (Adams et al. 2006; Holmes & Twiddy 2003; Lanciotti et al. 1994; Zhang et al. 2005; Santiago et al. 2012), y la inmunidad poblacional contra DENV (Recker et al. 2009; Adams et al. 2006). No obstante, existe información limitada sobre estos factores tanto a nivel

local como a nivel global, ya que aunque los análisis de secuencias de nucleótidos consenso de cepas de diferentes localidades han proporcionado cierto grado de conocimiento sobre la diversidad genética de los serotipos de DENV a nivel global, se dispone de pocos estudios que evalúen la variación genética entre las secuencias de virus de una misma localidad, recuperadas sobre una base regular, durante un período de tiempo prolongado. Del mismo modo, no está claro si la evolución y diversidad del virus responde a las condiciones ecológicas locales y las presiones inmunes de acogida. Estos análisis se han visto obstaculizados por las lagunas cronológicas y geográficas existentes en el registro virológico de las áreas donde el dengue es endémico, debido al escaso número de laboratorios habilitados para el aislamiento del virus y la falta de continuidad en los programas de vigilancia virológica a partir de muestras de pacientes y de mosquitos.

Los estudios dirigidos a identificar los factores que modulan la dinámica de circulación de DENV son importantes para la comprensión de la epidemiología del dengue. El presente trabajo tuvo el propósito de aportar conocimiento de calidad en esta área, tomando como modelo a DENV-3, al tiempo que permitir llenar algunos vacíos existentes en la vigilancia virológica realizada en las localidades de estudio.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

DENV es miembro del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, posee un genoma de ARN en sentido positivo de aproximadamente 11 kb de longitud, y se transmite a los humanos a través de la picadura de mosquitos hembras del género *Aedes*, causando una enfermedad de amplio espectro clínico conocida como dengue. DENV es una población heterogénea de cepas virales. Hasta la fecha se han identificado cuatro subpoblaciones o serotipos (DENV-1 -4) relacionados filogenéticamente, pero diferenciados serológicamente (Holmes & Twiddy 2003). La infección por cada serotipo produce inmunidad de larga duración para ese serotipo pero también de corta o larga duración (meses) para los otros serotipos.

Cada serotipo es a su vez una población genéticamente heterogénea. Sobre la base de secuencias del gen completo de la envoltura (E), y utilizando como punto de corte una divergencia del 6%, los serotipos de DENV se han dividido en diferentes genotipos (Holmes & Twiddy 2003), los cuales presentan una distribución geográfica particular (Usme-Ciro et al. 2014). En el caso de DENV-3, existen cinco genotipos (I-V) identificados hasta la fecha (Wittke et al. 2002). Durante las décadas del 60 y 70 circuló el genotipo V de DENV-3 en las Américas, incluyendo Colombia. Finalizando los años 70 el serotipo desapareció, reapareciendo nuevamente en 1994 en Panamá y Nicaragua pero ahora como genotipo III.

En áreas donde co-circulan diferentes serotipos de DENV su abundancia relativa muestra un patrón dinámico; esto es períodos de abundancia de uno o dos serotipos seguidos de períodos de escasez; se presume que el patrón de un serotipo está sujeto al patrón de los otros. De igual manera, se ha observado coincidencia entre el cambio del serotipo predominante y la ocurrencia de brotes o

epidemias. En Colombia hasta el año 2000, tres de los serotipos de DENV (DENV-1 -2 -4) co-circulaban tras su introducción en las décadas de los setentas y ochentas. En 2001, el DENV-3 se reintrodujo al país luego de 23 años de ausencia, lo que coincidió con epidemia en 2001-2002 (Ocazonez et al. 2006). Al igual que en Colombia, la re-introducción de DENV-3 en otros países de América, Asia y África se asoció con el desarrollo de epidemias de gran magnitud (de Mora et al. 2009).

Existe muy poca información sobre la dinámica de circulación de los serotipos en Colombia, ya que la vigilancia de DENV en el país se ha concentrado en la identificación del serotipo en un grupo no muy amplio de muestras procedentes de algunos municipios donde el dengue es endémico lo que limita establecer la abundancia de cada serotipo en el tiempo en las diferentes localidades, y determinar la dinámica de circulación de los serotipos del virus en el país. No obstante, estudios realizados por *Ocazonez y col.* del Cintrop en el AMB, Santander, durante los periodos 1998-2004 y 2007-2008, y en Ocaña, Norte de Santander en 2005-2006 establecieron la dinámica de circulación de los serotipos del virus en estas regiones durante los periodos descritos (Cortés et al. 2007; Ocazonez 2007; Ocazonez et al. 2006). En el AMB, Santander, la introducción de DENV-3 modificó la dinámica de circulación de los demás serotipos. El serotipo fue muy abundante entre 2002 – 2004 (85%) desplazando casi por completo a los demás serotipos en 2003 (97%). Para 2007 la abundancia de DENV-3 disminuyó llegando a ser muy escaso en 2008 (5%). La abundancia del serotipo coincidió con menos DENV-2 (de 70% en el 2000 a 6% en 2002-2004) y la escasez con más DENV-1 (de 10% en el 2000 a 85% en 2008) (Ocazonez et al. 2006). Se desconoce que sucedió con DENV-3 en la región a partir de 2008 luego de experimentar una marcada caída en su abundancia, pues no se encuentra información publicada sobre la dinámica de circulación de los serotipos para el período 2009-2015 en Santander. De igual manera no es claro si existe algún tipo

de interacción entre los serotipos que pueda estar direccionando la dinámica de circulación de los mismos.

Los factores que contribuyen a la dinámica de circulación de DENV-3 observada en el AMB se desconocen. Algunos autores han postulado que la abundancia oscilante de un serotipo en una localidad endémica, está directamente relacionada con mayor o menor aptitud biológica (fitness en inglés) de la población viral para mantenerse circulando entre humanos–mosquito (Adams et al. 2006; Holmes & Twiddy 2003). Los mecanismos determinantes del fitness en DENV no están claramente identificados. La diversificación genética de la población viral se ha propuesto, ya que se ha visto que cuanto más abundante es el serotipo, el genotipo experimenta diversificación y co-circulación de linajes (Ocazonez-jiménez et al. 2013; Santiago et al. 2012). Así mismo, se ha propuesto que esta alta diversificación genética favorece la variación fenotípica conducente a selección de cepas con mayor fitness. A su vez, la selección de variantes de alto fitness puede llevar a un barrido selectivo (selective sweep en inglés) y subsecuentemente al recambio de linajes llevando a mayor abundancia del serotipo. Estudios filogenéticos de DENV realizados en Puerto Rico (Santiago et al. 2012), Tailandia (Zhang et al. 2005), y China (Liang et al. 2013) soportan esta hipótesis. No obstante, el conocimiento sobre evolución y diversidad genética de la población de DENV-3 que circula en el AMB es limitado. Hasta la fecha se conoce solo un estudio que describe las relaciones filogenéticas de la población de DENV-3 circulante en Santander durante el periodo 2001-2007 realizado también por CINTROP, en el que se encontró un único genotipo (III) circulante, y donde se plantea como posible ruta de entrada del virus al AMB Bahamas → Venezuela → Cúcuta. Sin embargo, el diseño de este estudio (tamaño de muestra, periodo de observación y enfoque del análisis filogenético) no permitió obtener mayor conocimiento sobre eventos evolutivos, diversificación genética en el tiempo y co-circulación de linajes de DENV-3 en el AMB. Nueva información genética de otras

cepas de DENV-3 aisladas en el AMB durante 2001-2007 y de después de 2007 permitiría robustecer estos análisis.

Otro factor propuesto como determinante del patrón dinámico observado para los serotipos de DENV es la inmunidad contra DENV presente en la población. Algunos estudios usando modelos matemáticos han mostrado que la carga inmune al dengue determina la abundancia o escasez temporal de un serotipo (Prieto et al. 2013; Recker et al. 2009). Esto es, cuanto mayor el número de infectados con un serotipo mayor inmunidad protectora para este en la población humana y en consecuencia menor abundancia de éste en los años subsiguientes. La inmunidad previa de la población contra un serotipo puede además proteger de manera cruzada contra un serotipo distinto disminuyendo su fitness, o al contrario, la inmunidad cruzada puede incrementar el fitness del serotipo debido al fenómeno de potenciación de la infección dependiente de anticuerpos (Antibody Dependent Enhancement [ADE], sigla en inglés) (Adams et al. 2006; Guzman et al. 2013; Ubol & Halstead 2010; Endy et al. 2004). Al respecto, en los estudios de *Ocazonez y col.*, se observó coincidencia entre disminución de la proporción de infecciones secundarias en los pacientes con dengue del AMB durante 2002-2004 y el periodo de abundancia y predominio de DENV-3. Esta observación permite suponer que las cepas de DENV-3 poseen poca habilidad (fitness) para replicarse en presencia de anticuerpos para los otros serotipos, por lo que la inmunidad podría ser un factor que contribuye al patrón dinámico de DENV-3 observado en el AMB. Esta hipótesis requiere ser evaluada.

La identificación de los factores que modulan la dinámica de circulación de DENV es fundamental para entender la epidemiología del dengue. En el caso particular de DENV-3 de Colombia se desconoce su dinámica y particularmente en Santander desde 2008 hasta hoy. Se presume que en los casi 16 años de estar circulando en un escenario de alta endemia de dengue, como lo es el área

metropolitana de Bucaramanga, el virus puede haber experimentado diversificación genética dada la presencia de los otros serotipos y esto podría estar modificando la susceptibilidad de las cepas a la neutralización cruzada por anticuerpos.

2. JUSTIFICACIÓN

En las Américas, la incidencia, distribución, y gravedad del dengue han aumentado dramáticamente en los últimos tres decenios convirtiéndose en uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. El dengue genera una carga alta de discapacidad en trabajadores y escolares que se estima en 750.000 años de vida cada año. Aun así, ocupa el quinto lugar de la lista de enfermedades tropicales desatendidas en las Américas en términos de discapacidad. Esto acarrea gran carga económica a la región que se calcula en cerca de \$2.1 billones de dólares por año, superando las cifras atribuidas a otras enfermedades como las causadas por papilomavirus y rotavirus (Shepard et al. 2011; Castañeda-Orjuela et al. 2012). Durante la epidemia de 2010 Colombia ocupó el segundo lugar entre los países de América en número de casos reportados (157.152 casos) y se calcula que los costos aproximados por atención médica fueron cercanos a los \$90 millones de dólares, cifra que supera 10 veces el costo durante períodos de endemia (Bello et al. 2011). El 75% de los casos reportados en el país procede de 12 departamentos y Santander ha ocupado tradicionalmente los primeros lugares de la lista (Padilla et al. 2012).

La alta incidencia de casos por dengue, la ausencia de una terapia antiviral para el tratamiento médico y la insuficiencia en el control del *Ae. aegypti*, demuestran la urgente necesidad de una vacuna (Brandt 1990). En los últimos años ha habido avances significativos en el descubrimiento de la vacuna y en la actualidad se cuenta con varios candidatos (<http://www.denguevaccines.org>); la información disponible de estudios de eficacia de vacuna en América y Asia sugieren la importancia de conocer la dinámica de co-circulación de los serotipos del virus en los países endémicos candidatos a la introducción de la vacuna (Villar et al. 2013; Capeding et al. 2014). Dicho conocimiento puede obtenerse a través de la vigilancia virológica, un pilar básico de la vigilancia y el control del dengue desde

hace varias décadas, responsable de la identificación de cambios en la abundancia de cada uno de los serotipos y la genética de la población viral, y el estudio de su efecto sobre la incidencia de casos (de Mora et al. 2009; Cortés et al. 2007). No obstante, en Colombia la vigilancia virológica se ha concentrado en la identificación del serotipo a partir de un número reducido de muestras obtenidas en casos febriles que consultan en algunas ciudades del país. Esto limita establecer cambios en el tiempo en la dinámica de co-circulación de los serotipos, establecer la variabilidad genética de la población viral o identificar en tiempo real la introducción de una nueva variante del virus.

La comprensión de la epidemiología del dengue requiere de la realización de estudios que evalúen aspectos genéticos del virus. El auge de los estudios de secuenciación de DENV y la creación de bancos de genes ofrece una oportunidad única para la realización de este tipo de estudios, los cuales contribuirán a nuestra comprensión sobre la dinámica de la enfermedad, a nivel intra e Inter-hospedero.

Con el presente trabajo se intenta aportar al conocimiento de los factores que contribuyen a la dinámica viral tomando como modelo DENV-3 y si los mismos se relacionan con cambios en la incidencia del dengue. Nuestros resultados permitirán generar información de alta calidad, útil para el diseño de una política pública nacional de vigilancia de DENV. Esta propuesta de investigación es continuación de estudios previos realizados en Santander sobre el papel del virus en la ocurrencia del dengue en el período 1998 – 2008 (Ocazonez-jiménez et al. 2013; Ocazonez 2007; Ocazonez et al. 2006). Aquí se estudió además el período 2009 – 2010 cuando ocurrió la mayor epidemia de dengue que se haya reportado en el país.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cambios temporales en la abundancia (frecuencia relativa) de DENV-3 se asocian con cambios en la abundancia de otro serotipo, el estado inmunológico (tipo de infección) del huésped humano, la incidencia de la enfermedad y/o la diversificación genética de la población de DENV-3?

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre factores del individuo y de la población viral que contribuyen al mantenimiento de DENV-3 en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander en el periodo 2001-2010.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

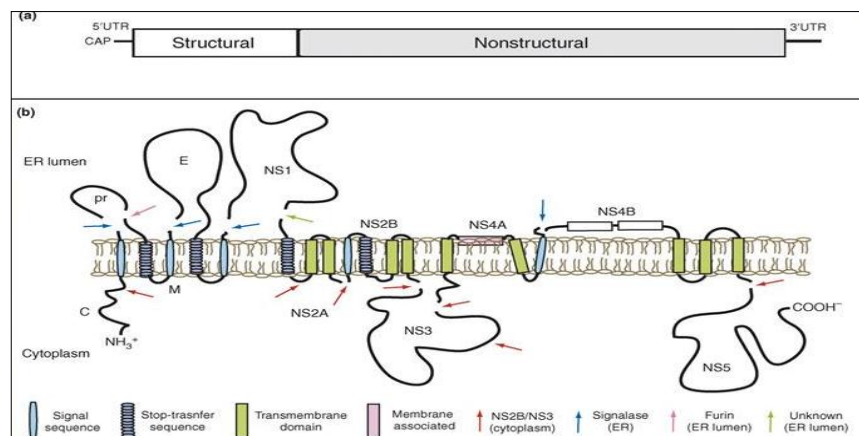
- Determinar la abundancia de DENV-3 relativa a los otros serotipos en relación con el patrón epidemiológico del dengue.
- Establecer la asociación entre frecuencia de infecciones primarias o secundarias por dengue y cambios en la abundancia del serotipo.
- Inferir la historia evolutiva de las cepas de DENV-3 que circularon en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander durante el periodo de estudio.
- Determinar la divergencia genética de la población viral en el tiempo y evaluar su posible asociación con cambios en la abundancia del serotipo.

5. MARCO DE REFERENCIA

5.1 DIVERSIDAD GENÉTICA DE DENV

El Virus Dengue (DENV), pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, y es transmitido a los humanos por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes* (especies *aegypti* y *albopictus*). DENV es un virus icosaédrico envuelto de aproximadamente 50 nm. El genoma viral consiste en una única hebra de ARN en sentido positivo de 11 Kb, que codifica para una poliproteína ininterrumpida de aproximadamente 3000 residuos de aminoácidos flanqueada por dos regiones no traducidas (UTR, por sus iniciales en inglés). La poliproteína da lugar a 3 proteínas estructurales (C, M, y E), y 7 proteínas no estructurales la NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 involucradas en la replicación viral (Perera & Kuhn 2008) (Figura 1).

Figura 1. Genoma y proteínas virales.



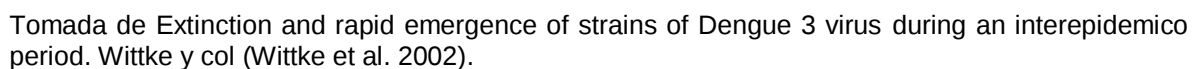
Tomada de Structural proteomics of dengue virus. Perera R. and Kuhn R.J. Current Opinion in Microbiology 2008, 11:369–77 (Perera & Kuhn 2008).

DENV existe como cuatro serotipos antigénicamente relacionados pero genéticamente distintos designados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4

(Holmes & Twiddy 2003). Cada serotipo es una población de cepas (individuos) heterogénea desde el punto de vista genético, que divergen filogenéticamente en ~30% a través de su poliproteína con una proporción relativa de variación de aminoácidos codificados en los genes en el orden NS2A, C, NS1, NS2B, E, NS4A, NS5, M, NS3, NS4B, desde el más al menos variable (Lanciotti et al. 1994; Holmes & Twiddy 2003). Por análisis evolutivos de la secuencia completa del gen E se ha establecido que DENV lleva al menos 1500 años circulando en la naturaleza, siendo DENV-3 el último grupo monofilético identificado hasta la fecha (Weaver & Vasilakis 2009). De igual manera existe abundante variación genética dentro de cada serotipo que se evidencia como racimos de secuencias filogenéticamente relacionadas (clusters en inglés) denominados genotipos (26 – 28). Según la clasificación de *Wittke y col* basada en el análisis filogenético de secuencias completas del gen E, el DENV-3 se agrupa en cinco genotipos (Figura 2) (Wittke et al. 2002). Cepas selváticas de DENV-3 no se han aislado hasta la fecha, pero se cree que existen en Malasia con base en la seroconversión de monos centinelas (Holmes 2006; Klungthong et al. 2008; Klungthong et al. 2004; Podder et al. 2006; Weaver & Vasilakis 2009).

Algunas conclusiones sobre diversidad en DENV que pueden extraerse de los análisis filogenéticos en el continente asiático son (i) que los serotipos con frecuencia co-circulan dentro de la misma localidad, (ii) que hay una posible distinción entre genotipos "endémicos" (aquellos que se han mantenido circulando por largos periodos de tiempo en bajos niveles de abundancia) y genotipos "epidémicos" (aquellos que se aíslan en mayor proporción durante un periodo de tiempo específico asociado a incremento de casos), (iii) que el sudeste asiático alberga la mayor cantidad de diversidad genética de DENV, que se entiende como la aparición de nuevos linajes o sub-linajes dentro de un genotipo y/o nuevos genotipos del serotipo, lo que sugiere que actúa como una población "fuente" en la que se generan cepas que a la postre causan epidemias en otros lugares, y (iv)

Figura 2. Árbol filogenético por Maximum likelihood del gen E de una muestra global de 50 secuencias de DENV-3.



Para explicar la diversidad genética de DENV se han propuesto algunos mecanismos. La principal fuente de cambio evolutivo en DENV ha sido asociada con la alta tasa de mutación producto de una ARN polimerasa propensa a errores de manera intrínseca que presentan todos los virus de ARN, para la que se ha estimado una tasa de $\sim 1 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio, por año (Twiddy et al. 2003). En relación a posibles mecanismos de selección natural de la población de DENV se ha planteado que la selección positiva es un proceso relativamente raro en dengue con sólo apariciones esporádicas en todo el genoma y entre serotipos (Twiddy et al. 2002), y que en consecuencia la mayoría de los cambios mutacionales en la población viral son neutrales. Así mismo se ha propuesto como presión de selección dominante en DENV a la selección purificante, en donde la mayoría de los cambios de aminoácidos son deletéreos (90%) pues reducen el fitness del virus y por lo tanto son eliminados de la población viral. Las pruebas más convincente sobre el papel de la selección purificante en DENV proviene de estudios sobre tasas relativas de sustituciones no sinónimas (d_N) a sinónimas (d_S) por sitio, con $d_S > d_N$ lo cual es indicativo de selección purificante (Holmes 2003). La recombinación también ha sido propuesta como fuente de cambio en DENV por algunos estudios filogenéticos pero sólo para secuencias relativamente divergentes (Craig et al. 2003; Holmes & Twiddy 2003). Sin embargo, este es un proceso poco común y no tiene un efecto importante sobre la evolución a nivel de población pues sólo existe de forma transitoria.

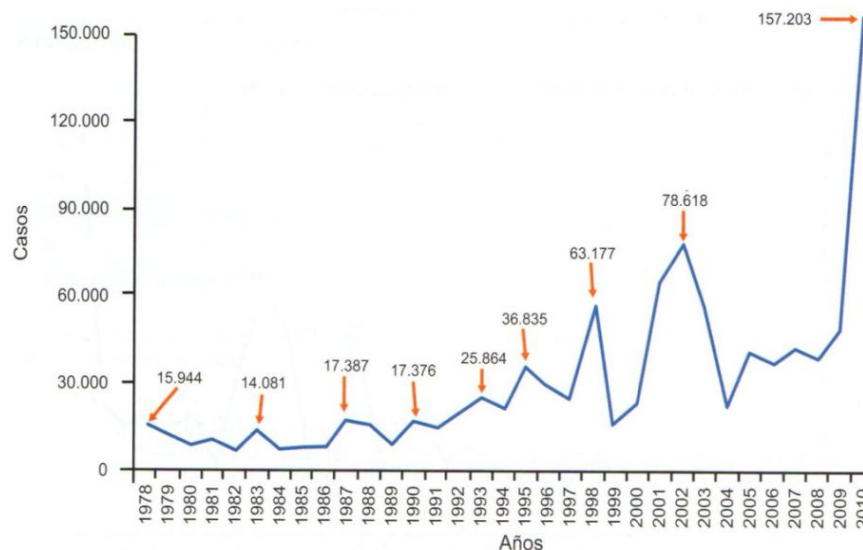
5.2 DENV-3 DE COLOMBIA

La presencia en el país de DENV-3 fue reportada por primera vez por el Dr. Boshel en 1975, con circulación documentada por aislamiento viral hasta 1978 (Boshell et al. 1986). En el año 2001, luego de 23 años de ausencia, el serotipo fue identificado nuevamente en Colombia durante la labor de vigilancia virológica

realizada por el Grupo de Virología del CINTROP, quien reportó los primeros aislamientos positivos de DENV-3 en el departamento de Santander (Ocazonez et al. 2006; Gómez et al. 2008). Este hallazgo fue ratificado durante 2002 por el INS quien reportó circulación del serotipo en el norte, sur y sureste del país (Ministerio de Salud y Protección Social & Instituto Nacional de Salud 2002). Ya en 2003, DENV-3 se había convertido en el serotipo predominante en el país, desplazando a los demás serotipos.

La reintroducción y subsecuente predominio de este serotipo entre 2001 y 2004 coincidió con una gran epidemia en el país (Figura 3) (Ocazonez et al. 2006). Este comportamiento fue informado en otros países de América como Nicaragua (Centers for Disease Control 1995), Panamá (Centers for Disease Control 1995), Brasil (Nogueira et al. 2001) y Venezuela (Uzcategui 2003). Luego del 2004 la abundancia de DENV-3 disminuyó considerablemente y durante el año 2008 estuvo casi ausente en el país (Ocazonez et al. 2006). Se desconoce que sucedió con DENV-3 luego de este periodo.

Figura 3. Epidemias de dengue en Colombia, 1978-2010.



Tomada de Padilla J, Rojas D, Sáenz R. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera. Bogotá; 2012 (Padilla et al. 2012).

El estudio de la historia evolutiva y genética de las cepas de DENV-3 circulantes en el país ha sido abordado en tres trabajos. El primero realizado por *Villabona-Arenas y col* evaluó la secuencia completa del gen E de DENV-3 de cepas aisladas en los departamentos de Santander y Norte de Santander en el periodo 2001-2007 identificándose al genotipo III como el único genotipo presente en la región durante el periodo de estudio (Villabona-Arenas et al. 2009). Este hallazgo fue ratificado en el estudio de *Ospina y Col* en el que se evaluó la secuencia completa de los genes M y E de DENV-3 de cepas aisladas entre 2002 y 2007 en el área metropolitana de Medellín, Colombia. En este estudio a su vez se reportó co-circulación de dos linajes diferentes del genotipo en el área de estudio (Ospina et al. 2010). Un último estudio fue realizado por *Usme y col*, en este estudio se evaluó una secuencia parcial del gen E de 224 bp (extremo 3'), de cepas de DENV-3 aisladas en diferentes departamentos del país, documentándose co-circulación de dos genotipos del serotipo, el III y I en la Guajira, Guaviare y Huila (Usme-Ciro et al. 2008). Este último estudio presenta dos debilidades importantes, la primera es que se empleó un fragmento corto de genoma viral que podría no ser lo suficientemente informativo; y la segunda el hecho de que las secuencias reportadas como genotipo I son casi idénticas a la de la cepa de referencia H87 de Filipinas, lo cual podría sugerir una contaminación cruzada con la cepa prototipo. En la actualidad no se dispone de información adicional que permita establecer con precisión si el genotipo I realmente ha circulado en Colombia.

5.3 PAPEL DEL VIRUS EN LA OCURRENCIA DE EPIDEMIAS

Durante las últimas tres décadas los casos de dengue en las Américas se han incrementado 4,6 veces (~1 millón de casos durante los 80s a 4,7 millones durante 2000-7) (San Martín et al. 2010), lo cual se ha traducido en un incremento significativo de la carga de la enfermedad (morbilidad y mortalidad), sus costos y la discapacidad atribuible a la misma en la región. La expansión de un nicho

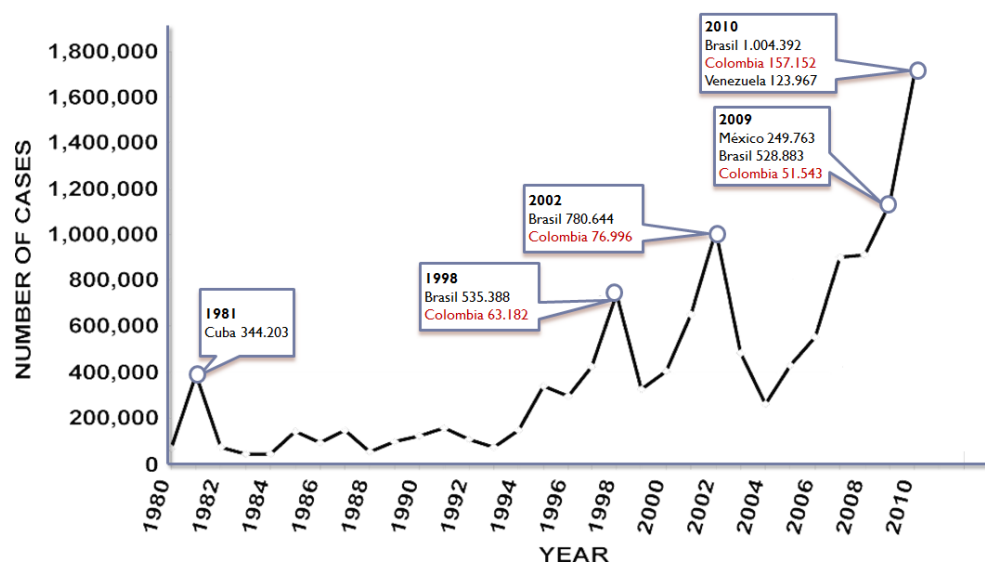
ecológico favorable para *Aedes aegypti* y el incremento considerable de la movilidad humana han favorecido la propagación de DENV a más de 100 países, donde cerca de 2,5 billones de personas se encuentran a riesgo de contraer la infección y se presume que anualmente alrededor de 50 millones se infectan (Guzman et al. 2010). En América las epidemias por DENV ocurren cada 3 a 5 años con variación en la proporción de casos graves (Figura 4) (San Martín et al. 2010).

La ocurrencia de epidemias de dengue se ha asociado a múltiples factores siendo los de mayor peso los incrementos de la infestación por *Ae. Aegypti*, del número de individuos susceptibles y la población viral (Liebman et al. 2012; Recker et al. 2009; Zhang et al. 2005; Adams et al. 2006). Con respecto al virus, se ha visto que la ocurrencia de una epidemia en áreas de baja endemicidad ha coincidido con introducción de un serotipo nuevo, re-introducción de un serotipo ausente por varios años (DENV-3) e introducción de otro genotipo del serotipo (Gómez et al. 2008; Dash et al. 2006; Kouri et al. 1986; Guzmán et al. 1996). En áreas hiperendémicas, es decir donde co-circulan los 4 serotipos, el papel del virus es más complejo y por lo mismo difícil de precisar. Sin embargo existen algunos trabajos que establecen que el cambio del serotipo más abundante es concomitante con la ocurrencia de brote o epidemia (Ocazonez et al. 2006; Montoya et al. 2013).

Durante la epidemia de 2010 Colombia ocupó el segundo lugar del continente en número de casos reportados, con un total de 157.152, 9.482 graves (6%) y 217 muertes confirmadas por esta causa (4,7 veces más que durante el 2009). Siendo el departamento de Santander uno de los departamentos con mayor reporte de casos (Instituto Nacional de Salud 2010).

El patrón de circulación de los serotipos y genotipos de DENV en Colombia ha sido poco estudiado (Villar et al. 2015). La información disponible al respecto para el nororiente del país ha sido generada en estudios realizados por *Ocazonez y col* en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander (1998-2004 y 2007-2008), y el municipio de Ocaña, Norte de Santander (2005-2006).

Figura 4. Evolución del dengue en las Américas, 1980–2010.



Modificada de The History of Dengue Outbreaks in the Americas. Brathwaite O, San Martín J, Montoya R, Del Diego J, Zambrano B, and Dayan G. Am. J. Trop. Med. Hyg., 87(4), 2012, pp. 584–593 (Brathwaite Dick et al. 2012).

En estos estudios se observó que la abundancia de DENV-1 durante 1998-1999 coincidió con epidemia, tras lo cual el serotipo experimentó una disminución progresiva en su abundancia llegando a ser muy escaso en 2004. Todas las cepas de DENV-1 aisladas durante este periodo se agruparon dentro del genotipo V del virus, con circulación de cuatro linajes del serotipo, observándose coincidencia entre cambios en la abundancia del virus y el reemplazo de linajes del genotipo, que a su vez coincidió con el aumento en la abundancia de DENV-2 entre 2000-

2001, lo que a su vez se asoció con el incremento de las formas graves de la enfermedad (Ocazonez-jiménez et al. 2013).

La re-introducción de DENV-3 en 2001 coincidió con epidemia y disminución de DENV-2. Durante el periodo 2002-2004 DENV-3 fue muy abundante, tras lo cual disminuyó considerablemente siendo muy escaso en 2007-2008 cuando DENV-1 predominó nuevamente (Ocazonez et al. 2006; Ocazonez-jiménez et al. 2013). En el caso de DENV-3 el genotipo III fue identificado como el único de la población viral que circuló en Santander entre 2001-2007 (Villabona-Arenas et al. 2009).

5.4 FACTORES ASOCIADOS A CAMBIOS DE ABUNDANCIA DE DENV

La abundancia oscilante de un serotipo en una localidad endémica se postula está directamente relacionada con mayor o menor capacidad de transmisión (fitness) de la población viral para mantenerse entre humanos – mosquitos (Adams et al. 2006; Holmes & Twiddy 2003). Aunque los factores determinantes del fitness no están claramente identificados la diversificación genética de la población viral se ha propuesto, pues se ha visto que cuanto más abundante es el serotipo mayor diversidad genética experimenta, lo cual se evidencia en la diversificación en linajes de un genotipo o co-circulación de varios genotipos (Nogueira et al. 2008; Ocazonez-jiménez et al. 2013).

Como ya se ha descrito, la diversificación genética de una cepa se ha atribuido a la alta tasa de mutación que presenta DENV y al proceso de selección positiva. Estos dos mecanismos, han sido sugeridos por *Santiago y col* como posible explicación de los cambios de abundancia observados en las cepas de DENV-3 que circularon en Puerto Rico durante el periodo de 1998-2007. El fenómeno de cuello de botella ha sido a su vez relacionado como posible explicación a la menor abundancia del serotipo (Santiago et al. 2012). Estudios filogenéticos con DENV

de Puerto Rico (Lanciotti et al. 1994), Tailandia (Zhang et al. 2005), India (Dash et al. 2006) y Vietnam (Liang et al. 2013) soportan estas deducciones.

Zhang C. y col, en un estudio realizado en Bangkok (periodo de 1974 a 2002), observaron una correlación inversa entre la predominancia de DENV-1 y DENV-4, en donde la diversidad genética (aparición de clados) dentro de DENV-1 alcanzaba su máximo en los momentos de alta predominancia del serotipo, y el reemplazo o extinción de clados se asociaba con los períodos de baja predominancia. Además, un pico en la predominancia de DENV-1 fue observado cuando circularon simultáneamente los genotipos I y III del virus en asociación con bajos niveles de DENV-4 (1980); el aumento de DENV-4 se asoció a su vez con desaparición del genotipo III (1994) y sustitución de clados de DENV-1 (2002) (Zhang et al. 2005). Hallazgos similares fueron reportados por *Adams y Col* en Bangkok (Adams et al. 2006).

La inmunidad contra DENV de una población se ha planteado como otro factor determinante de la abundancia o escasez temporal de un serotipo (Recker et al. 2009; Prieto et al. 2013). El aumento del número de individuos infectados con un serotipo incrementa la inmunidad de grupo específica de serotipo, lo cual afecta la tasa de transmisión viral y conlleva a menor abundancia del mismo. Así mismo, la inmunidad previa de la población contra un serotipo puede proteger de manera cruzada contra un serotipo distinto disminuyendo su fitness. Al respecto *Zhang y col* proponen que los eventos de reemplazo de clados de DENV observados en su estudio pueden ser el resultado de una susceptibilidad diferencial de las cepas a la respuesta inmune de reacción cruzada, en donde los linajes o clados que sobreviven son subgrupos de virus resistentes a la neutralización debido a cambios genéticos que los diferencian antigénicamente de las cepas susceptibles (Adams et al. 2006; Zhang et al. 2005). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que los eventos de recambio de clados documentados hasta la fecha se fundamentan en la comparación de la secuencia del gen E, que codifica para el principal antígeno de superficie de DENV, por lo que algunos de los cambios

observados pueden traducirse en sustitución de aminoácidos en la proteína (Recker et al. 2009; Zhang et al. 2005; Liebman et al. 2012; Adams et al. 2006). De otro lado, la inmunidad cruzada también puede incrementar el fitness de un serotipo contribuyendo a un aumento de su abundancia debido al fenómeno documentado de inmunopotenciación mediada por anticuerpos (Antibody Dependent Enhancement [ADE], sigla en inglés) (Guzman et al. 2013; Endy et al. 2004; Adams et al. 2006; Ubol & Halstead 2010).

Para el caso de Colombia se presume que las personas con inmunidad previa a otros serotipos pudieron estar protegidas contra DENV-3 por respuesta cruzada (Ocazonez et al. 2006). Esto debido a que durante la reintroducción de DENV-3 en Colombia se esperaba que ocurrieran un gran número de infecciones de tipo secundario ya que los demás serotipos habían circulación de manera continua desde los 80s, por lo que una proporción considerable de la población del país ya habría estado expuesta al menos a un serotipo de DENV, pero esto no ocurrió. En Colombia, al igual que en Centro América (Panamá, Nicaragua y México) (Pinheiro & Corber 1997; Centers for Disease Control 1995; Guzmán et al. 1996), la mayoría de infecciones por DENV-3 registradas durante el periodo 2001-2004 se asociaron con el desarrollo de formas leves de la enfermedad e infecciones primarias (80.3%) (Ocazonez 2007).

Este comportamiento no fue igual en otros países de la región. En Brasil por ejemplo, el predominio de DENV-3 dos años después de su introducción por primera vez en el año 2000 se asoció con una grave epidemia en términos de severidad de las manifestaciones clínicas y muertes atribuidas a este serotipo (Nogueira et al. 2005).

6. DISEÑO METODOLÓGICOS

6.1 DISEÑO

6.1.1 *Tipo de estudio.* Estudio longitudinal.

6.1.2 *Área de estudio.* AMB, Santander, Colombia. El AMB se encuentra conformada por los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta. Concentra el 54.5% de la población del departamento de Santander, con un estimado de 1.122.945 habitantes (Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE 2015). Los 4 municipios del AMB registran alrededor del 75% de los casos de dengue reportados por el departamento.

6.1.3 *Definición de las variables de estudio.* Se evaluaron cuatro variables relacionadas con factores virológicos, inmunológicos y epidemiológicos del dengue:

- Abundancia de DENV-3: se refiere a la frecuencia anual de DENV-3 relativa a los otros serotipos.
- Historia evolutiva y diversidad genética de DENV-3: Relaciones filogenéticas de las cepas de DENV-3 y variabilidad genética relativa de la población viral en el tiempo.
- Tipo de infección: presencia de anticuerpos de tipo IgG anti DENV en muestra de fase aguda.
- Actividad del dengue en la localidad: total de casos y tasa de incidencia de dengue reportados en el área de estudio.

6.2 ABUNDANCIA DE DENV-3 RELATIVA A LOS OTROS SEROTIPOS DEL VIRUS: 2009-2010.

6.2.1 *Sueros Incluidos en el estudio.* Se procesaron un total de 212 sueros agudos (obtenidos antes del 5to día de síntomas de la enfermedad) de sujetos febriles con diagnóstico confirmado de dengue captados durante el periodo 2009-2010 en instituciones de salud del AMB para el proyecto de investigación “AEDES: abordando áreas endémicas de dengue para el estudio de su severidad” (Colciencias - código 110245921561, UIS - fondo 8676), ejecutado por el Grupo de Epidemiología Clínica del Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la UIS, bajo la dirección del Dr. Luis Ángel Villar. El dengue se confirmó por la presencia de anticuerpos IgM o antígeno NS1 por el ensayo de ELISA, o por RT-PCR. Desde su obtención y hasta su procesamiento los sueros fueron almacenados en la Unidad de Muestras Biológicas de la red AEDES a -70°C. Para la realización del estudio se obtuvo la debida autorización para hacer uso de los mismos. La distribución temporal de las muestras procesadas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución temporal de los sueros para aislamiento viral

Año	Mes												Sub-total
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
2009	*	*	*	*	15	9	12	16	8	8	1	6	75
2010	11	17	14	18	16	18	12	18	8	3	2	0	137
Total	11	17	14	18	31	27	24	34	16	11	3	6	212

*Meses sin colecta de sueros

6.2.2 *Aislamiento viral.* Cada suero se procesó para intentar aislar DENV siguiendo el protocolo establecido en el laboratorio de Arbovirus – CINTROP, descrito en estudios previos (Ocazonez et al. 2006). Brevemente, 100 µl de suero diluido (1:30) se adicionó a células de mosquito *Aedes albopictus* (clon C6/36). Luego de 1h de incubación a 32°C para absorción viral se adicionó 1 ml de medio Leibovitz (L15) suplementado con 2% de suero bovino fetal y se incubó a 32°C por 10 días. Transcurrido el periodo descrito, se realizó pase ciego del sobrenadante

de cultivo e incubó a 32°C por un nuevo periodo de 10 días. Se realizó observación diaria de los cultivos con el fin de vigilar la aparición de efecto citopático (ECP). Cuando el ECP se evidenció en al menos el 50% de la monocapa del cultivo o finalizado el periodo de observación, se investigó la presencia del virus en los cultivos mediante Inmunofluorescencia Indirecta con un anticuerpo policlonal (M29341 - CDC, Puerto Rico). El sobrenadante de cultivos positivos por IFI (aislamiento exitoso) se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, alicuotó y almacenó a -70°C.

6.2.3 Identificación del serotipos de las cepas virales aisladas. El serotipo de 80 de las cepas aisladas fue establecido por RT-PCR en tiempo real, usando el estuche comercial CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay (Inserto KK0128 disponible en <http://www.cdc.gov/dengue>) donado por el Dr. Jorge Muñoz-Jordán del Center for Diseases Control and Prevention – CDC, Puerto Rico, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Santiago et al. 2013).

Brevemente, el RNA viral fue extraído del sobrenadante de cultivo usando el estuche comercial QIAamp® viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. El RNA viral extraído fue transcrito a DNA copia (cDNA) y amplificado usando la enzima SuperScript III Platinum One-Step (Invitrogen, cat # 11732-088) en una reacción de tipo multiplex donde 5µL de una dilución del ARN extraído se mezcló con los siguientes reactivos: 2,2µl de H₂O libre de nucleasas, 12,5 µl de 2x premix, 0,5µl de primers para DENV-1 y DENV-3 (concentración final 1 mM), 0,25µL de primers para DENV-2 y DENV-4 (concentración final 500 nM), 0,45µL de cada sonda TaqMan (concentración final 180 nM), y 0,5µl de SuperScript III Platinum One-Step, para un volumen final de reacción de 25µl. La reacción de transcripción inversa (RT) se llevó a cabo durante 30 min a 50°C seguido de la inactivación de la RT durante 2 min a 95°C; la amplificación y detección de fluorescencia se realizó durante 45

ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C durante 1 min en el termociclador IQ5 de Bio-Rad. La emisión de fluorescencia se detectó por la emisión de los fluoróforos 5'-FAM DENV-1 BHQ1-3', 5'-HEX DENV-2 BHQ1-3', 5'- Texas Red DENV-3 BHQ2-3' y 5'-Cy5 DENV-4 BHQ3-3'. Las curvas de amplificación para cada serotipo se evaluaron de forma individual, teniendo en cuenta la línea umbral.

Para 10 cepas el serotipo fue establecido por RT-PCR anidada como parte del proceso de tipificación de rutina del laboratorio de Arbovirus del CINTROP.

6.2.4 Almacenamiento de cepas aislada. Se realizaron alícuotas de 200 µl del sobrenadante de las cepas aisladas las cuales fueron etiquetadas y organizadas en relación al serotipo y año de aislamiento, y almacenadas a -70°C.

6.3 ESTUDIO GENETICO DE DENV-3

6.3.1 Obtención de secuencias del gen E.

6.3.1.1 Región del genoma viral. Para el análisis filogenético se eligió la secuencia completa del gen E (1.479 nucleótidos) que codifica para la proteína de envoltura de DENV. La proteína E es el principal antígeno de superficie del virus, además de que contiene determinantes responsables de la adhesión del virus a las células del huésped y de la fusión de membranas. Debido a los efectos directos que las mutaciones en este gen podrían tener sobre funciones biológicamente importantes del virus, el gen E es un marcador molecular potencialmente informativo de cambios evolutivos significativos. Además ha demostrado contener señal filogenética suficiente para generar árboles robustos y para realizar inferencias sobre parámetros evolutivos de interés. Por tal razón es posible encontrar secuencias del gen E de múltiples aislados en GenBank.

6.3.1.2 *Selección de cepas virales.* Veintisiete cepas de DENV-3 del periodo de estudio (2001-2010) fueron seleccionadas para secuenciación, con el objetivo de contar con una muestra representativa a lo largo de los años. De ellas, 14 cepas fueron obtenidas durante el presente estudio (periodo 2009-2010), y las 13 restantes (periodo 2001-2008) se seleccionaron a partir de la colección de virus del Laboratorio de Virología del CINTROP. Todos los virus fueron replicados en células C6/36 y almacenados a -70°C hasta su análisis. Sólo aislados primarios o primeros pases del virus fueron utilizados en este estudio.

6.3.1.3 *Amplificación del gen E y secuenciación.* El RNA viral fue extraído del sobrenadante del cultivo por el método de Trizol® (Invitrogen) siguiendo el protocolo del laboratorio de virología del Cintrop. El RNA fue transcrito a DNA copia (cDNA) usando “random hexamers” y la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) en la mezcla de reacción del fabricante. La reacción se llevó a cabo por 60 min a 42°C, 10 min a 70°C y 1 min a 4°C. El cDNA fue usado como plantilla para amplificar el gen E con dos juegos de “primers” específicos para DENV-3 (Tabla 2). La amplificación se realizó por 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 53.3°C (primers 1 y 2) o 51°C (primers 3 y 4) por 1 min, y 72°C por 30 seg, con una extensión final a 72°C por 5 min. La calidad del producto amplificado fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. El producto de la PCR fue almacenado a -20°C hasta su remisión para secuenciamiento.

50µl del producto amplificado fueron enviados a la compañía MacroGen DNA Sequencing Service en Seúl, Corea, para su purificación y secuenciamiento, siguiendo el protocolo de transporte de la compañía. La compañía realiza la purificación del ADN con el sistema Wizard PCR Preps (Promega) y el secuenciamiento en el Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer con el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1.

Para la secuenciación del gen de interés se emplearon los mismos primers de amplificación más tres primers adicionales (Primers 5-7, Tabla 2). Las secuencias obtenidas para las 27 cepas procesadas fueron ensambladas en el programa SeqMan de DNSTAR y serán depositadas en GenBank.

Tabla 2. Primers para amplificación y secuenciación del gen E de DENV-3

No.	Identificador	Secuencia	Tamaño en pb	Posición Genómica
1	D3-880F	5´ - GACCCAGAAGGCGGTTATTT-3´	20	880-899
2	D3-2119R	5´ - GCCTCGAACATCTTCCCAATA -3´	21	2119-2139
3	D3-2008F	5´ - GAAGGAGGAGCCTGTCAATAT -3´	21	2008-2028
4	D3-3161R	5´ - TGTAGTTGTGTTGCGAGATAGG -3´	22	3161-3182
5	D3-1343F	5´ - TACACCGTYATCATCACAGTG -3´	21	1343-1363
6	D3-1390R	5´ - TGACTCCCTGCGTTTCATTT-3´	20	1390-1409
7	D3-2429R	5´ - TTCTTTGCCTTTCCAGTTTAT-3´	21	2429-2449

6.3.2 *Construcción de la base de secuencias.* Secuencias del gen E completo (1.479 nucleótidos) de cepas de Santander (n=50) obtenidas en el presente estudio (Tabla 3) y secuencias obtenidas en estudios previos (Tablas 4), de otros departamentos del país (n=31) (Tabla 5) y de DENV-3 aislados en las Américas (n=72), junto con representantes de cada genotipo del virus (n=5) obtenidas del banco de genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabla 6), fueron alineadas entre sí mediante el algoritmo de Muscle disponible en MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net>).

Las secuencias fueron seleccionadas para maximizar la representación por país, año, y subtipo teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de Villabona y col (Villabona-Arenas et al. 2009).

Tabla 3. Cepas de DENV-3 de donde se obtuvo la secuencia del gen E en el presente estudio

Cepa	Año de aislamiento	Identificador
02-084	2002	02084.SAN.CO.02
02-132	2002	02132.SAN.CO.02
02-288	2002	02288.SAN.CO.02
LV-053	2003	LV053.SAN.CO.03
LV-105	2003	LV105.SAN.CO.03
LV-110	2003	LV110.SAN.CO.03
LV-117	2003	LV117.SAN.CO.03
LV-126	2003	LV126.SAN.CO.03
LV-220	2003	LV220.SAN.CO.03
07-031	2007	07031.SAN.CO.07
07-051	2007	07051.SAN.CO.07
07-158	2007	07158.SAN.CO.07
08-069	2008	08069.SAN.CO.08
LV-121020-14	2009	LV121020.SAN.CO.09
LV-191015-14	2009	LV191015.SAN.CO.09
LV-192097-14	2009	LV192097.SAN.CO.09
LV-111036-14	2010	LV111036.SAN.CO.10
LV-111044-14	2010	LV111044.SAN.CO.10
LV-111053-14	2010	LV111053.SAN.CO.10
LV-111082-14	2010	LV111082.SAN.CO.10
LV-111159-14	2010	LV111159.SAN.CO.10
LV-121155-14	2010	LV121155.SAN.CO.10
LV-132056-14	2010	LV132056.SAN.CO.10
LV-141006-14	2010	LV141006.SAN.CO.10
LV-141047-14	2010	LV141047.SAN.CO.10
LV-141095-14	2010	LV141095.SAN.CO.10
LV-151064-14	2010	LV151064.SAN.CO.10

Los virus circularon en el área metropolitana excepto los del 2007 que son de otros municipios de Santander. Virus del 2009-2010 fueron aislados en el presente estudio y los de otros periodos en estudios previos (Ocazonez et al. 2006; Gómez et al. 2008)

Tabla 4. Secuencias del gen E de DENV-3 de Santander obtenidas del GenBank.

Cepa	Año	GenBank	Identificador
COD3_01330	2001	FJ189451	01330.SAN.CO.01
DENV-3/CO/BID-V3392/2001*	2001	GU131950	V3392.SAN.CO.01
COD3_01072	2001	FJ189450	01072.SAN.CO.01
DENV-3/CO/BID-V2978/2001*	2001	GQ199891	V2978.SAN.CO.01
COD3_02200	2002	FJ204475	02200.SAN.CO.02
DENV-3/CO/BID-V3393/2002*	2002	GQ868571	V3393.SAN.CO.02
COD3_LV073	2003	FJ189458	LV073.SAN.CO.03
COD3_LV057	2003	FJ189456	LV057.SAN.CO.03
COD3_LV038	2003	FJ189455	LV038.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V3399/2003*	2003	GU131952	V3399.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V3394/2003*	2003	GU131951	V3394.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V3398/2003*	2003	GQ868574	V3398.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V3397/2003*	2003	GQ868573	V3397.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V3395/2003*	2003	GQ868572	V3395.SAN.CO.03
DENV-3/CO/BID-V2984/2003*	2003	FJ898443	V2984.SAN.CO.03
COD3_LV433	2004	FJ189461	LV433.SAN.CO.04
COD3_LV357	2004	FJ189459	LV357.SAN.CO.04
DENV-3/CO/BID-V3401/2004*	2004	GU131953	V3401.SAN.CO.04
DENV-3/CO/BID-V3400/2004*	2004	GQ868575	V3400.SAN.CO.04
COD3_07302	2007	FJ189466	07302.SAN.CO.07
COD3_07181	2007	FJ189465	07181.SAN.CO.07
DENV-3/CO/BID-V3405/2007*	2007	GQ868578	V3405.SAN.CO.07
DENV-3/CO/BID-V2988/2007*	2007	FJ898445	V2988.SAN.CO.07

*Secuencias obtenidas por el Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Genome Sequencing Center for Infectious Disease; Genome Resources in Dengue Consortium, con participación del grupo CINTROP (Schmidt et al. 2011)

Tabla 5. Secuencias del gen E de DENV-3 de otros departamentos de Colombia obtenidas del GenBank.

Cepa	Año	No de acceso	Identificador
16407_MEDELLIN/02	2002	FJ389909	16407.ANT.CO.02
15859_BELLO/02	2002	FJ389908	15859.ANT.CO.02
11049_MEDELLIN/03	2003	FJ389911	11049.ANT.CO.03
5292_MEDELLIN/03	2003	FJ389907	5292.ANT.CO.03
5952_BELLO	2003	HM030553	5952.ANT.CO.03
5379_ITAGUI	2003	HM030552	5379.ANT.CO.03
2836_ENVIGADO	2003	HM030549	2836.ANT.CO.03
31233_BELLO/04	2004	FJ389912	31233.ANT.CO.04
22379_MEDELLIN/04	2004	FJ389910	22379.ANT.CO.04
18206_MEDELLIN/05	2005	FJ389916	18206.ANT.CO.05
12363_MEDELLIN	2005	HM030556	12363.ANT.CO.05
3832_MEDELLIN/06	2006	FJ389915	3832.ANT.CO.06
4943_BOLIVAR/06	2006	FJ389913	4943.ANT.CO.06
7370_MEDELLIN	2006	HM030555	7370.ANT.CO.06
28888_COPACABANA	2006	HM030551	28888.ANT.CO.06
3454_MEDELLIN/07	2007	FJ389914	3454.ANT.CO.07
2731_COCORNA	2007	HM030557	2731.ANT.CO.07
6003_COPACABANA	2007	HM030554	6003.ANT.CO.07
2754_ITAGUI	2007	HM030550	2754.ANT.CO.07
3419_MEDELLIN/07	2007	FJ389906	3419.ANT.CO.07
JAC_ENVIGADO	2009	HM030558	JAC.ANT.CO.09
DENV-3/CO/BID-V3403/2005* ⁺	2005	GQ868577	V3403.NSA.CO.05
DENV-3/CO/BID-V3402/2005* ⁺	2005	GQ868576	V3402.NSA.CO.05
DENV-3/CO/BID-V2986/2005* ⁺	2005	FJ898444	V2986.NSA.CO.05
COD3_OC400*	2006	FJ189464	OC400.NSA.CO.06
COD3_OC384*	2006	FJ189463	OC384.NSA.CO.06
COD3_OC283*	2006	FJ204476	OC283.NSA.CO.06
DENV-3/CO/BID-V3404/2006* ⁺	2006	GU131954	V3404.NSA.CO.06
COD3_C88**	2004	FJ189467	C88.VAC.CO.04
COD3_C108**	2005	FJ189468	C108.VAC.CO.05
COD3_02211***	2002	FJ189452	02211.CO.02
CI/DB029/2007***	2007	JF804042	DB029.CO.07

*: Valle del Cauca, **: Norte de Santander, ***: Departamento desconocido. Las demás son de virus de Antioquia. ⁺ Secuencias obtenidas por el Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Genome Sequencing Center for Infectious Disease; Genome Resources in Dengue Consortium, con participación del grupo CINTROP (Schmidt et al. 2011)

Tabla 6. Secuencias del gen E de DENV-3 de países de América y Asia obtenidas del GenBank.

Cepa	Año	País	No de acceso	Identificador
ARG6733-07	2007	Argentina, Buenos Aires	EU052796	6733.AR.07
FSB 413/2003	2003	Bolivia, Santa Cruz	DQ177886	413.BO.03
68784	2000	Brasil, Rio de Janeiro	AY038605	68784.BR.00
BR74886/02	2002	Brasil, Rio de Janeiro	AY679147	74886.BR.02
D3BR/BV4/02	2002	Brasil, Boa Vista	DQ118865	BV4.BR.02
D3BR/CU6/02	2002	Brasil, Cuiaba	DQ118866	CU6.BR.02
D3BR/MA1/02	2002	Brasil, Manaus	DQ118869	MA1.BR.02
D3BR/PV5/02	2002	Brasil, Porto Velho	DQ118875	PV5.BR.02
D3BR/SG2/02	2002	Brasil, Sao Geraldo do Araguaia	DQ118880	SG2.BR.02
D3BR/SL3/02	2002	Brasil, Sao Luis	DQ118881	SL3.BR.02
D3BR/GO5/03	2003	Brasil, Goiania	DQ118867	GO5.BR.03
D3BR/IG10/03	2003	Brasil, Iguape	DQ118868	IG10.BR.03
D3BR/MR9/03	2003	Brasil, Marituba	DQ118870	MR9.BR.03
D3BR/PV1/03	2003	Brasil, Porto Velho	DQ118871	PV1.BR.03
D3BR/RP1/03	2003	Brasil, Ribeirao Preto	DQ118877	RP1.BR.03
D3BR/BR8/04	2004	Brasil, Braganca	DQ118864	BR8.BR.04
D3BR/PP15/04	2004	Brasil, Paranapebas	DQ118878	PP15.BR.04
D3BR/ST14/04	2004	Brasil, Santarem	DQ118882	ST14.BR.04
DENV-3/BR/BID-V2403/2008*	2008	Brasil, Northern	FJ850094	V2403.BR.08
D3_BR_RP_AI95_2009	2009	Brasil, Ribeirao Preto	GQ330473	RPAI951.BR.09
Cuba116/00	2000	Cuba	AY702032	116.CU.00
Cuba580/01	2001	Cuba	AY702030	580.CU.01
Cuba21/02	2002	Cuba	AY702031	21.CU.02
OBS8852/2000	2000	Ecuador, Guayas	DQ177898	8852.EC.00
OBS8857/2000	2000	Ecuador, Cañar	DQ177899	8857.EC.00
H87	1956	Filipinas	L11423	H87.PH.56
29472	1992	Fiji	L11422	29472.FJ.92
HN179	1995	Honduras	FJ189469	HN179.HN.95
D3/H/IMTSSA-MART/1999/1243	1999	Martinica	AY099337	1243.MQ.99
D3/H/IMTSSA-MART/2000/1567	2000	Martinica	AY099338	1567.MQ.00
D3/H/IMTSSA-MART/2001/2012	2001	Martinica	AY099340	2012.MQ.01
MEX6097	1995	México	AY146763	6097.MX.95
4841/YUCATAN-MX/95	1995	México, Yucatán	DQ341202	4841.MX.95
6584/YUCATAN-MX/96	1996	México, Yucatán	DQ341203	6584.MX.96
6889/QUINTANA ROO-MX/97	1997	México, Quintana Roo	DQ341205	6889.MX.97
OAXACA-MX/00	2000	México, Oaxaca	DQ341207	OAX.MX.00
Nicaragua24/94	1994	Nicaragua	AY702033	24.NI.94

Tabla 6. **Continuación**

Cepa	Año	País	No de acceso	Identificador
DENV-3/NI/BID-V2653/2008*	2008	Nicaragua, Managua	FJ850048	V2653.NI.08
DENV-3/NI/BID-V3069/2009*	2009	Nicaragua, Managua	GQ199865	V3069.NI.09
DENV-3/NI/BID-V5449/2009*	2009	Nicaragua, León	JF920404	V5449.NI.09
DENV-3/NI/BID-V5101/2009*	2009	Nicaragua, RAAS	JF920407	V5101.NI.09
DENV-3/NI/BID-V5482/2010*	2010	Nicaragua, Chinandega	JF920401	V5482.NI.10
DENV-3/NI/BID-V5467/2010*	2010	Nicaragua, León	JF920405	V5467.NI.10
PANAMA/94	1994	Panamá	DQ341209	PA94.PA.94
D3PY/AS12/02	2002	Paraguay, Asunción	DQ118884	AS12.PY.02
D3PY/AS10/03	2003	Paraguay, Asunción	DQ118883	AS10.PY.03
D3PY/PJ5/03	2003	Paraguay, Pedro Juan Caballero	DQ118888	PJ5.PY.03
OBT412/Tumbes-2000	2000	Perú, Tumbes	DQ177903	412.PE.00
FSP581/Piura-2001	2001	Perú, Piura	DQ177890	581.PE.01
IQD1728/Iquitos-2002	2002	Perú, Iquitos	DQ177895	1728.PE.02
FST145/Tumbes-2003	2003	Perú, Tumbes	DQ177891	145.PE.03
FSL1212/Yurimaguas-2004	2004	Perú, Yurimaguas	DQ177888	1212.PE.04
FST 346/Tumbes-2004	2004	Perú, Tumbes	DQ177894	346.PE.04
MFI624/Iquitos-Jan.2005	2005	Perú, Iquitos	DQ177897	624.PE.05
OBT4024/Lima-Comas	2005	Perú, Lima	DQ177902	4024.PE.05
DENV-3/PE/BID-V6263/2008*	2008	Perú	KJ189261	V6263.PE.08
1340	1977	Puerto Rico	L11434	1340.PR.77
DENV-3/US/BID-V1049/1998*	1998	Puerto Rico	EU482558	V1049.PR.98
DENV-3/US/BID-V1076/1999*	1999	Puerto Rico	EU529696	V1076.PR.99
DENV-3/US/BID-V1077/2000*	2000	Puerto Rico	EU529697	V1077.PR.00
DENV-3/US/BID-V2114/2001*	2001	Puerto Rico	FJ547079	V2114.PR.01
DENV-3/US/BID-V1476/2002*	2002	Puerto Rico	EU687196	V1476.PR.02
DENV-3/US/BID-V1078/2003*	2003	Puerto Rico	EU482564	V1078.PR.03
DENV-3/US/BID-V1091/2004*	2004	Puerto Rico	EU529704	V1091.PR.04
DENV-3/US/BID-V1617/2005*	2005	Puerto Rico	FJ182007	V1617.PR.05
DENV-3/US/BID-V1043/2006*	2006	Puerto Rico	EU482555	V1043.PR.06
DENV-3/US/BID-V1415/2007*	2007	Puerto Rico	EU596492	V1415.PR.07
SK698	1990	Sri Lanka	FJ189449	SK698.LK.90
ThD3_1309_97	1997	Tailandia, Bangkok	AY676405	1309.TH.97
LARD5990	2000	Venezuela, Aragua	AY146764	5990.VE.00
LARD6318	2000	Venezuela, Aragua	AY146768	6318.VE.00
LARD6722	2001	Venezuela, Aragua	AY146775	6722.VE.01
LARD7812	2001	Venezuela, Aragua	AY146777	7812.VE.01
C02-003/Maracay 2001	2001	Venezuela, Maracay	DQ367720	C02003.VE.01

Tabla 6. **Continuación**

Cepa	Año	País	No de acceso	Identificador
DENV-3/VE/BID-V904/2001*	2001	Venezuela, Caracas	EU482612	V904.VE.01
C23-009/Maracay 2003	2003	Venezuela, Maracay	DQ367721	C23009.VE.03
C29-008/Maracay 2003	2003	Venezuela, Maracay	DQ367722	C29008.VE.03
DENV-3/VE/BID-V1591/2004*	2004	Venezuela, Caracas	EU854291	V1591.VE.04
DENV-3/VE/BID-V1590/2004*	2004	Venezuela, Caracas	FJ373304	V1590.VE.04
DENV-3/VE/BID-V1593/2005*	2005	Venezuela, Caracas	EU854292	V1593.VE.05
DENV-3/VE/BID-V2267/2008*	2008	Venezuela, Aragua	FJ639826	V2267.VE.08
DENV-3/VE/BID-V2268/2008*	2008	Venezuela, Aragua	FJ639827	V2268.VE.08

* Secuencias obtenidas por el Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Genome Sequencing Center for Infectious Disease; Genome Resources in Dengue Consortium (Schmidt et al. 2011)

6.3.3 Análisis filogenético. La historia evolutiva de DENV-3 y divergencia genética de la población viral en el tiempo se estimaron por inferencia bayesiana con los programas MrBayes v3.2.5 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>) y BEAST v1.8.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>).

La selección estadística del mejor modelo de sustitución de nucleótidos se realizó en el programa MEGA6. El modelo con el puntaje de “Bayesian Information Criterion” (BIC) más bajo se consideró el que mejor describía los patrones de sustitución. El modelo seleccionado fue Tamura y Nei 1993 (TN93), seguido por el modelo “General Time-Reversible” (GTR), ambos con distribución gamma para la tasa de variación entre sitios.

Se realizó análisis filogenético por el método de probabilidades bayesianas en el programa MrBayes. Se corrieron dos análisis simultáneos de cuatro cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) cada uno, por 1.000.000 de generaciones. Los estados de las cadenas fueron muestreados cada 1000 generaciones. Los análisis se detuvieron cuando las cadenas convergieron a un promedio de las desviaciones estándar de las frecuencias de los “splits” inferior a 0,02. Un árbol consenso por mayoría del 50% se calculó excluyendo el primer 20% de la muestra

de cada corrida (“burn-in”). Para este análisis se empleó el modelo de sustitución de nucleótidos GTR + gamma, ya que TN93, no se encuentra entre las opciones de análisis de Mr Bayes.

Para estimar la diversidad genética de la población viral en el tiempo y otros parámetros evolutivos, tres análisis independientes de 20 millones de generaciones cada uno se corrieron en BEAST, y posteriormente se consolidaron con el programa LogCombiner v1.8.1. Para estos análisis se empleó el modelo de sustitución de nucleótidos TN93 con distribución gamma para la tasa de variación entre sitios (TN93 + gamma), un reloj molecular relajado (“uncorrelated lognormal relaxed clock”), y un modelo de coalescencia tipo “Bayesian Skygrid”. El análisis de la verosimilitud de la hipótesis del reloj molecular fue realizado por comparación de los valores ML para la topología obtenida en el análisis bayesiano con y sin reloj. La hipótesis nula de igualdad en la tasa evolutiva en todo el árbol fue rechazada con un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). El análisis fue realizado en el programa MEGA6.

El programa TRACER v1.6 fue empleado para la visualización y verificación de la distribución estacionaria y el tamaño efectivo de muestreo (ESS) de los parámetros evolutivos estimados en MrBayes y BEAST. El programa FigTree v1.4.2 se utilizó para dibujar los árboles filogenéticos.

6.4 TIPO DE INFECCION PERIODO 2007-2010.

6.4.1 *Sueros incluidos en el estudio.* Con el objeto de robustecer la información sobre tipo de infección disponible, se evaluaron 254 sueros agudos de casos de dengue confirmado por laboratorio (detección del virus por aislamiento viral, RT-PCR o detección de antígeno NS1 y/o detección de anticuerpos IgM para dengue),

colectados en 2007 (n=50), 2008 (n=30), 2009 (n=74) y 2010 (n=100) en estudios previos realizados por el Grupo de Epidemiología Clínica (Tabla 7, proyectos 6 y 8). Los sueros se encontraban almacenados en la Unidad de Muestras Biológicas de la red AEDES a -70°C. Para la realización del estudio se obtuvo la debida autorización para hacer uso de los mismos.

6.4.2 *ELISA IgG*. Los sueros fueron procesados para detectar la presencia de anticuerpos IgG anti-dengue usando el estuche comercial Panbio® Dengue IgG Capture ELISA, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Se consideró infección primaria la ausencia de anticuerpos IgG para dengue e infección secundaria la presencia.

6.5 ANALISIS DE DATOS.

6.5.1 *Periodo de observación*. Se incluyó para análisis información de las variables descritas correspondientes al periodo 2000 a 2010. Se evaluó tanto información secundaria como información obtenida en el presente trabajo. La información secundaria se obtuvo de las siguientes fuentes:

- a. Publicaciones de estudios previos: Referencias 12 y 16.
- b. Bases de datos de los grupos CINTROP y Epidemiología Clínica, autorizadas por los orientadores del trabajo.
- c. Bases de datos disponibles en sitios web: los datos demográficos para el AMB fueron obtenidos a través de la página del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, <http://www.dane.gov.co/>).
- d. Comunicación personal: La información del total de casos para los cuatro municipios del AMB durante el periodo 2000-2010 publicados en el libro “Dengue en Colombia, epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia” (Padilla et al. 2012), fueron obtenidos por comunicación personal con la Dra.

Diana Rojas coautora del mismo. Se recurrió a esta fuente ya que en los informes de comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia publicados por el Instituto Nacional de Salud no se detallan las cifras de casos por municipios para los diferentes departamentos.

La Tabla 7 presenta información sobre los estudios previos liderados por los grupos CINTROP y Epidemiología Clínica que generaron los datos usados en el presente estudio. La Tabla 8 presenta los datos de incidencia del dengue en el AMB de Santander en la ventana de observación del estudio.

Tabla 7. Relación de proyectos fuente de información secundaria para el estudio.

#	Nombre del proyecto	Periodo	Fuente de financiación	Convenio
1	Identificación de serotipos de virus dengue circulantes en Bucaramanga y su área metropolitana.	1998 - 2001	COLCIENCIAS	1102-98-4130
2	Identificación de genotipos de virus e inmunidad tipo específica más frecuentemente asociados con epidemias y severidad del dengue.	2002 - 2004	COLCIENCIAS	1102-04-13042
3	Monitoreo de los serotipos del virus del dengue en el departamento de Santander.	2001 - 2004	Gobernación de Santander Secretaría de Salud.	007-2001, 2002, 2003, 2004
4	Estudio de factores que pueden contribuir a la ausencia de casos de fiebre amarilla urbana en Colombia.	2005 - 2007	COLCIENCIAS	1102-04-16376
5	Validación de una definición clínica de dengue y evaluación de su utilidad para identificar tempranamente las condiciones asociadas a hospitalización.	2005-2006	COLCIENCIAS	1102-04-18205
6	Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue (SAFI).	2007-2008	COLCIENCIAS	110234319192.
7	Monitoreo de los serotipos del virus del dengue en el departamento de Santander.	2007 - 2008	Gobernación de Santander Secretaría de Salud.	2007-068000-0070
8	Estudio Multicéntrico Colombiano "AEDES": Abordando áreas endémicas de dengue para el estudio de su severidad.	2009-2010	COLCIENCIAS	1102-459-21561

La información del año 2000 se empleó como punto de referencia de las variables de estudio con el objeto de evaluar el efecto de DENV-3 sobre las mismas tras su reintroducción. Para el año 2005 los datos de abundancia de los serotipos del

DENV y tipo de infección fueron interpolados con relación al comportamiento de estas variables en los años 2004 y 2006, pues no se disponía de dicha información.

6.5.2 *Datos de incidencia del dengue en el AMB.* Se estimaron tasas de incidencia de dengue basadas en datos agrupados, con sus respectivos IC95%, para ello se emplearon las cifras del total de casos de dengue y datos poblacionales del DANE para el AMB (Tabla 8).

Tabla 8. Datos de incidencia del dengue en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander usados en este estudio.

AÑO	Total Casos Dengue*	Población**	Incidencia (Tasa por 100.000 hab)
2000	874	966079	90
2001	5818	979318	594
2002	6123	991491	618
2003	5523	1002870	551
2004	345	1013773	34
2005	4642	1024325	453
2006	5036	1034782	487
2007	3479	1044995	333
2008	2702	1055099	256
2009	7933	1065041	745
2010	15155	1074918	1.410

Fuentes: *: Información de libro “Dengue en Colombia, epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia” suministrada por la Dra. Diana Rojas. **: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE).

6.5.3 *Correlación entre abundancia de DENV-3 relativa a los otros.* La abundancia del DENV-3 y demás serotipos se expresó en términos de frecuencia relativa en el tiempo; esto es el total de cepas del serotipo aisladas, sobre el total de aislamientos del periodo (año).

Se evaluó la existencia de correlación entre las abundancias relativas de los serotipos del DENV mediante la estimación del coeficiente de correlación de Spearman, tanto para datos concurrentes (del mismo año) como no concurrentes, es decir, los observados en diferentes años.

6.5.4 Abundancia relativa de DENV-3/diversidad de serotipos y su relación con la incidencia de dengue. Se empleó regresión múltiple de Poisson para modelar Razones de tasas de incidencia (RTI, para la incidencia agrupada de casos de dengue) en función de la abundancia relativa de DENV-3 mayor o menor al 50% ajustando por año de registro; explorando relaciones tanto para datos concurrentes como no concurrentes.

Para investigar la relación entre la co-circulación de los serotipos sobre la actividad del dengue en el AMB, se calculó un índice de biodiversidad de Shannon (IS) dependiente del tiempo. El IS, es uno de los índices utilizados para cuantificar biodiversidad específica, y refleja la heterogeneidad de una población (para el caso la población de DENV) sobre la base de dos factores: el número de especies presentes (para este caso los serotipos) y su abundancia relativa (Pla 2006). Este parámetro fue empleado por *Recker y cols* en un estudio previo sobre dinámica de transmisión de los serotipos de DENV en el sur de Vietnam (Recker et al. 2009).

El cálculo del IS por año se realizó utilizando la frecuencia relativa de cada serotipo para cada año por su logaritmo natural, mediante la siguiente formula:

$$H(t) = \sum_{i=1...4} p_i(t) \log(p_i(t))$$

Donde, $p_i(t)$ es la frecuencia relativa del serotipo i en el tiempo t .

Finalmente, se exploró la relación entre el IS y las tasas de incidencia siguiendo la misma metodología mencionada para DENV-3.

6.5.5 Abundancia de DENV-3/serotipos y su relación con tipo de infección. El tipo de infección para dengue en la población se calculó en términos de proporciones para cada año, esto es el total de muestras con anticuerpos IgG para dengue

(infecciones secundarias), sobre el total de muestras procesadas en el periodo (año).

Para evaluar la asociación entre el serotipo y el tipo infección, se realizó un análisis de subgrupo de los sujetos en que se logró aislar DENV y se tenía información disponible de edad y tipo de infección. La evaluación de hipótesis entre proporción de infecciones primaria y secundarias por serotipo se realizó mediante la prueba chi-cuadrado, con el número apropiado de grados de libertad. Se empleó regresión logística múltiple para modelar Odds para el tipo de infección de acuerdo al serotipo, ajustando por edad y año de registro.

6.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

6.6.1 *Obtención de las muestras.* El presente estudio no realizó ninguna intervención en humanos. Las muestras de suero y cepas virales evaluadas fueron obtenidas por estudios previos del Grupo de Epidemiología Clínica, del Centro de Investigaciones Epidemiológicas – CIE y el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales – CINTROP, y se encontraban almacenadas en los Biobancos de dichos grupos de investigación bajo la administración de la Dra. Raquel Ocazonez y el Dr. Luis Ángel Villar, directores de la propuesta (Tabla 7). Dichos estudios fueron investigaciones de carácter observacional realizadas en el área metropolitana durante el periodo descrito y se rigieron por la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud calificando como "Investigaciones con riesgo mínimo", contando además con la aprobación del Comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (Anexo 1 y 2). Como requisito previo para la inclusión y toma de muestras de sangre de los pacientes en estos estudios los sujetos realizaron el proceso de consentimiento informado que incluía la autorización para uso del suero en estudios futuros (Anexo 3 y 4).

6.6.2 *Proceso de codificación de las muestras de estudio.* Con el propósito de resguardar el anonimato e información personal de los individuos proveedores de las muestras de estudio, inmediatamente las muestras ingresaban al laboratorio se realizaba un proceso de codificación de las mismas mediante la asignación de un código alfanumérico. Este identificador único fue el que se empleó durante la selección de las muestras a procesar, la creación de la base de datos del estudio y el análisis de resultados. En ningún momento se tuvo acceso a datos personales como nombre, número de documento de identidad o fecha de nacimiento, dicha información en su momento fue archivada de forma segura y se encuentra bajo la custodia de los investigadores principales de los estudios mencionados previamente. Adicionalmente, la información clínica requerida de los sujetos donantes de la muestra (edad, fecha de inicio de síntomas, días de enfermedad y procedencia) fue tratada de acuerdo a las disposiciones establecidas en la ley estatutaria No 1581 de 2012 del Congreso Colombiano por la cual se dictan las disposiciones generales para la protección de datos personales y Resolución UIS 1227 de 2013.

6.6.3 *Cumplimiento de regulaciones éticas y normas de bioseguridad.* De acuerdo a las regulaciones contenidas en la resolución 008430 de 1993, el decreto 2164 de 1992 y la Ley 10 de 1990 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia por las cuales se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas de la investigación en salud, y según lo estipulado en el Título II: “De la investigación en seres humanos”, capítulo I: “De los aspectos Éticos de la investigación en seres humanos” - artículo 11, el presente trabajo de investigación clasifica como una investigación sin riesgo debido a que no se realizó ninguna intervención directa en los individuos donantes de las muestras de estudio.

Así mismo, en el Título IV: “De la bioseguridad de las investigaciones”; capítulo I: “De la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos”, se establecen los lineamientos generales para garantizar la

Bioseguridad en investigación, en donde de acuerdo al artículo 67, el presente trabajo de investigación califica en el grupo de riesgo II. Por esta razón y teniendo en cuenta además las directrices establecidas en el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para un Laboratorio con nivel de bioseguridad básico grado 2, durante la ejecución de los procedimientos técnicos requeridos para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo se garantizaron y cumplieron todas las normas de Bioseguridad pertinentes.

6.6.4 *Aplicación de principios éticos.* Luego de analizar los 4 principios éticos de acuerdo a la última actualización (2009) del libro “Principles of biomedical ethics” de Beauchamp y Childress, concluimos que el presente trabajo de investigación no compromete los principios de Autonomía, No maleficencia y Justicia, debido a que el estudio tiene una naturaleza observacional. Así mismo se garantiza el principio de Beneficencia ya que el trabajo fue desarrollado con el objetivo de obtener información de alta calidad, útil para el diseño de una política pública nacional de vigilancia del DENV y la definición de una política para la introducción de una vacuna contra el virus dengue, lo cual permitirá optimizar el uso de los recursos de salud pública destinados a la atención de la enfermedad y realizar un mejor abordaje del paciente con dengue.

Finalmente, el presente trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander en el acta No 11 del 12 de mayo de 2015 (Anexo 5).

7. RESULTADOS

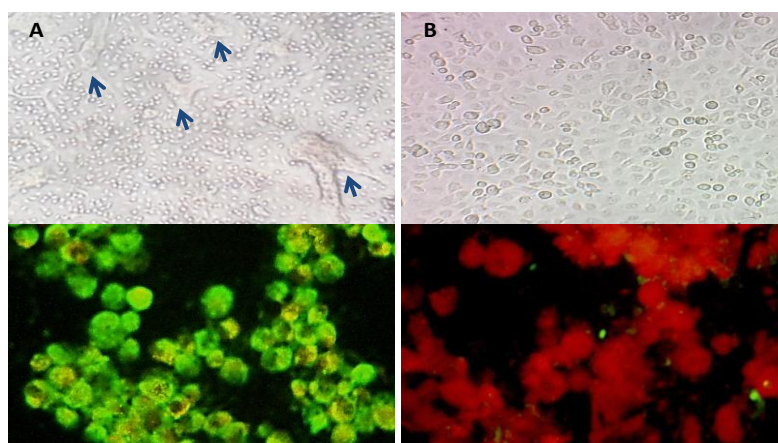
7.1 ABUNDANCIA DE DENV-3 RELATIVA A LOS OTROS SEROTIPOS EN EL AMB.

7.1.1 Serotipos en el periodo 2009-2010. En el presente estudio se procesaron un total de 212 sueros con el propósito de establecer la abundancia de los serotipos de DENV durante el periodo 2009-2010. La recuperación del virus fue exitosa en 42% de las muestras procesadas, aislándose un total de 90 cepas de DENV (17 y 73 cepas de 2009 y 2010 respectivamente). Los cuatro serotipos de DENV fueron confirmados en los aislamientos del periodo, siendo el más frecuente DENV-1 (36%), seguido de DENV-3 (33%), DENV-4 (28%) y DENV-2 (3%) (Tabla 9, Figuras 5-6).

Tabla 9. Distribución temporal de las cepas aisladas periodo 2009-2010

Año	Serotipo: n(%)			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
2009	8 (47)	1 (5)	4 (24)	4 (24)
2010	24 (33)	2 (3)	26 (35)	21 (29)
Total	32 (36)	3 (3)	30 (33)	25 (28)

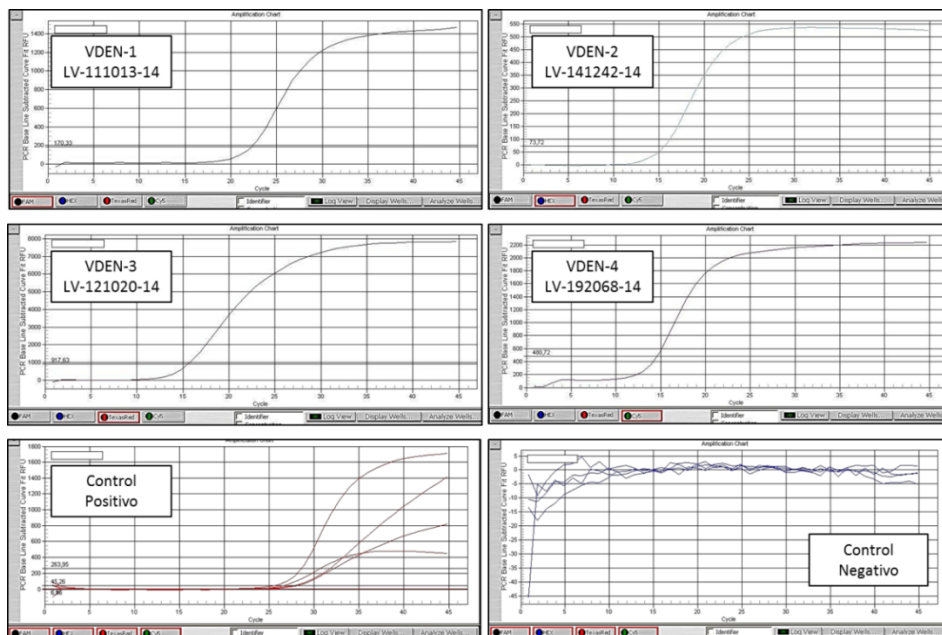
Figura 5. Evidencia de aislamiento primario de DENV en el estudio.



A: suero de paciente con dengue se adicionó a la monocapa y a los 10 días se registró el efecto citopático (flechas, imagen superior), sugiriendo aislamiento primario de DENV. El efecto citopático se confirmó por inmunofluorescencia (imagen inferior).

B: control: células sin suero.

Figura 6. Evidencia de resultados de serotipificación de cepas de DENV aisladas en el estudio.



Curvas de amplificación por RT-PCR en tiempo real. El recuadro indica el serotipo y código del aislado. En el borde inferior izquierdo se evidencia el fluoróforo que emitió la fluorescencia. De izquierda a derecha se encuentra: FAM=DENV-1, HEX=DENV-2, TexaRed=DENV-3 y Cy5=DENV-4. El control positivo empleado en el ensayo detecta los cuatro serotipo.

7.1.2 Distribución temporal de los serotipos de DENV en el periodo de observación: 2000-2010. Para determinar la abundancia relativa de los serotipos de DENV y describir su comportamiento en el tiempo se empleó información obtenida en estudios previos y en el presente trabajo (Tablas 7 y 10).

DENV-3 fue el serotipo predominante durante el periodo de estudio (48%), seguido en frecuencia por DENV-1 (23%), DENV-2 (15%) y DENV-4 (14%), sin embargo su abundancia fluctuó en el tiempo (Figura 7). Tras su reintroducción en 2001, DENV-3 fue muy abundante entre 2002-2006 (75%), desplazando casi por completo a los demás serotipos en 2003 (97%). Durante 2007-2008 la abundancia de DENV-3 disminuyó considerablemente comparada con el periodo 2002-2006 (24% vs. 75%, respectivamente) llegando a ser escaso en 2008 (8%). En 2009 la abundancia de DENV-3 mostró un nuevo incremento convirtiéndose en el serotipo predominante en 2010 (36%).

La abundancia de DENV-3 en 2002-2004 coincidió con disminución de DENV-2 (de 70% en 2000 a 6% en 2002-2004), y su nuevo incremento en 2009-2010 con

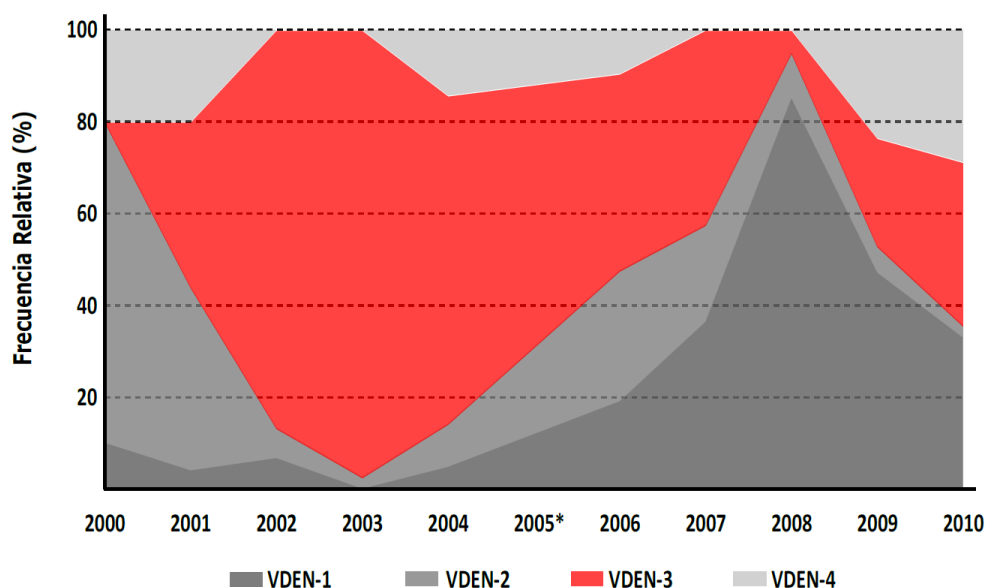
disminución de DENV-1 (de 85% en 2008 a 33% en 2010). Así mismo, el periodo de escasos de DENV-3 coincidió con incremento del DENV-1 (de 19% en 2006 a 84% en 2008).

Tabla 10. Datos sobre distribución temporal de serotipos de DENV en Santander usados para análisis en este estudio.

Año	Total Virus	Serotipo: n(%)			
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
2000	10	1 (10)	7 (70)	0 (0)	2 (20)
2001	26	1 (4)	10 (38)	9 (35)	6 (23)
2002	14	1 (7)	1 (7)	12 (86)	0 (0)
2003	38	0 (0)	1 (3)	37 (97)	0 (0)
2004	23	1 (4)	2 (9)	17 (74)	3 (13)
2006	21	4 (19)	6 (28)	9 (43)	2 (10)
2007	35	13 (37)	8 (23)	14 (40)	0 (0)
2008	12	10 (84)	1 (8)	1 (8)	0 (0)
2009	17	8 (48)	1 (6)	4 (23)	4 (23)
2010	73	24 (33)	2 (3)	26 (36)	21 (29)
Total	269	63 (23)	39 (15)	129 (48)	38 (14)

Datos de 2000-20004, 2006, 2007-2008 fueron obtenidos en los estudios previos (Tabla 7) (Ocazonez et al. 2006; Ocazonez-jiménez et al. 2013). Datos de 2009-2010 fueron obtenidos en el presente estudio.

Figura 7. Abundancia de DENV-3 relativa a los otros serotipos en el departamento de Santander, 2000-2010.



Las áreas sombreadas describen la abundancia (frecuencia relativa en porcentajes) en el tiempo de cada serotipo. *Datos interpolados, durante este año no fue posible realizar vigilancia virológica en el AMB. Datos de 2000-20004, 2006, 2007-2008 fueron obtenidos en los estudios previos (Tabla 7) (7,16). Datos de 2009-2010 fueron obtenidos en el presente estudio.

Con el propósito de evaluar la asociación entre el patrón de circulación de DENV-3 y los otros serotipos, se realizó un análisis de correlación entre las abundancias relativas de los serotipos en función del tiempo evaluadas tanto de manera concurrente (para el mismo año) como para el año inmediatamente posterior (desfase de un año).

No se observó correlación entre abundancia del DENV-3 y abundancia de los otros serotipos. Se observó cierta tendencia negativa entre DENV-3 y los demás serotipos evaluadas de manera concurrente (Tabla 11), siendo esta mayor con DENV-2 (-0.51). Evaluadas con desfase de un año la correlación negativa de DENV-3 se mantuvo con DENV-1 (-0.35) y DENV-4 (-0.56), pero no con DENV-2 (-0.09) (Tabla 12). Estos resultados sugieren un posible efecto reductor de DENV-3 sobre los demás serotipos. Así mismo, la abundancia de DENV-1 el año anterior al índice a su vez se correlacionó negativamente con DENV-3, lo cual sugiere que la abundancia de DENV-1 podría tener a su vez un efecto reductor sobre DENV-3 en el año siguiente. Correlaciones similares se observaron además entre DENV-1 y DENV-2, y entre DENV-2 y DENV-4. No obstante ninguna de estas correlaciones alcanzó un nivel de significancia estadística por lo que estos resultados no son concluyentes.

Tabla 11. Correlación entre abundancia relativa de los serotipos de DENV para el periodo 2000-2010 evaluada de manera concurrente.

Serotipo	DENV-3	DENV-1	DENV-2	DENV-4
DENV-3	1.00			
DENV-1	-0.36	1.00		
DENV-2	-0.51	-0.25	1.00	
DENV-4	-0.26	0.20	-0.09	1.00

Las frecuencias relativas de los datos de aislamiento para cada serotipo por año presentados en la tabla 10 se compararon con la prueba de correlación de Spearman. Se presentan los coeficientes de correlación.

Tabla 12. Correlación entre abundancia relativa de los serotipos de DENV en cada año comparado con el inmediatamente posterior, para el periodo 2000-2010.

Serotipo	Año posterior			
	DENV-3	DENV-1	DENV-2	DENV-4
DENV-3	0.33	-0.35	-0.09	-0.56
DENV-1	-0.56	0.59	-0.41	0.33
DENV-2	-0.08	0.07	0.54	-0.27
DENV-4	-0.03	-0.18	0.08	0.16

Las frecuencias relativas de los datos de aislamiento para cada serotipo por año presentados en la tabla 10 se compararon con la prueba de correlación de Spearman. Se presentan los coeficientes de correlación.

7.2 RELACION ENTRE EL PATRÓN EPIDEMIOLOGICO DEL DENGUE Y DENV-3 / CO-CIRCULACION DE SEROTIPOS.

La tasa de incidencia del dengue en el AMB osciló entre 34 - 1.410 casos por 100,000 habitantes con picos epidémicos en 2002 (618) y 2010 (1.410) y un periodo interepidémico de alrededor de 7 años. La re-introducción y expansión de DENV-3 en 2001-2003 coincidió con incremento de la tasa de incidencia del dengue: 90 en el 2000 versus 587 para el periodo 2001-2003. Así mismo, un nuevo incremento del serotipo entre 2009–2010 coincidió también con incremento del dengue: tasa de incidencia de 256 en 2008 versus 1077 en 2009-2010 (Figuras 7-8). Estos dos momentos de predominancia de DENV-3 coincidieron además con los picos epidémicos descritos.

Para evaluar la existencia de una asociación entre la predominancia de DENV-3 y la tasa de incidencia del dengue se realizó un análisis de regresión con el fin de modelar razones de tasas de incidencia en función de una abundancia relativa de DENV-3 menor ó mayor o igual a 50%. La asociación se evaluó tanto para datos concurrentes (abundancias y tasas del mismo año) como no concurrentes (abundancias y tasas en diferentes años). Se encontró que la abundancia de DENV-3 $\geq 50\%$ se asoció a una incidencia del dengue 9.4% veces superior,

comparada con periodos en donde la abundancia del serotipo fue <50%, ajustando por año de registro ($p < 0.05$). Sin embargo, al evaluar la asociación entre la abundancia relativa de DENV-3 observada 1-2 años antes y la incidencia de casos en el año índice, se observó que una mayor abundancia precedía a una menor probabilidad de casos: Razón de tasas de incidencia de 0.63 (IC95%: 0.62 - 0.65) y 0.60 (IC95%: 0.59 - 0.62) al evaluar 1 y 2 años precedentes, respectivamente.

El primer hallazgo soporta lo observado durante el pico epidémico en 2002, pero no explica lo observado en 2004 ya que aunque DENV-3 fue predominante (71%) la tasa de incidencia de dengue disminuyó notoriamente con respecto al año anterior (551 vs 34 casos por 100,000 habitantes) sugiriendo que la abundancia sostenida del serotipo no necesariamente lleva a mayor número de infecciones. Por otra parte, la disminución en la probabilidad de casos de dengue observada 1-2 años luego de un periodo de marcado predominio del serotipo, podría ser el resultado de una disminución en el número de individuos susceptibles.

El hecho que la predominancia de DENV-3 no explique en su totalidad la ocurrencia de brotes o epidemias y que durante el periodo de observación los cuatro serotipos de DENV hayan co-circulado en la localidad, permite suponer que en áreas hiper-endémicas el comportamiento de la enfermedad no puede ser explicado de manera independiente por un serotipo sino por la interacción entre todos ellos. Teniendo en cuenta esta hipótesis, se decidió evaluar la asociación entre la co-circulación de serotipos y la tasa de incidencia del dengue en el área de estudio a través del índice de diversidad de Shannon (IS). Se observó una relación de proporcionalidad directa entre el IS y la tasa de incidencia del dengue cuando estos fueron evaluados concurrentemente (Tabla 13; Figura 8), en donde una diferencia en el IS de 0.1 unidades se asoció con un incremento del 6.3% (IC95%: 6.1%-6.7%) en la tasa de incidencia. Aunque en el periodo 2002-2003 la

asociación entre IS y tasa de incidencia del dengue no se mantuvo ya que la disminución del IS coincidió con incremento de la tasa de incidencia del dengue, durante el periodo de estudio el patrón de proporcionalidad directa entre el IS y la tasa de incidencia del dengue fue el que predominó. Al evaluar la asociación entre el IS observado 1-2 años antes y la incidencia de casos en el año índice, se encontró que la asociación entre el IS y la incidencia se acentuó al considerar el IS del año inmediatamente anterior: incremento de 8.4% (IC95%: 8.1%-8.7%) por 0.1 unidades. Por el contrario, al evaluar la relación entre el IS dos años antes del año índice, este se asoció con disminución de la incidencia del dengue en 2.6% (IC95%: 2.4%-2.9%).

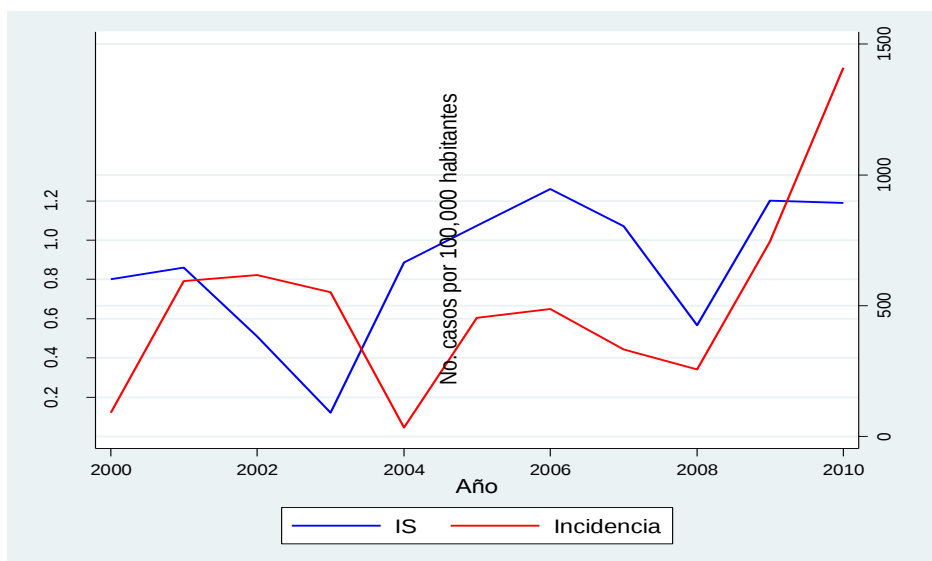
Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una compleja interacción entre la dinámica individual de los serotipos y el patrón del dengue en el AMB; en donde un aumento en la diversidad provocaría un aumento posterior en la incidencia de la enfermedad, lo que en sí mismo puede causar un cambio en el patrón de circulación de los serotipos, en donde el serotipo más competente (con mayor *fitness*) desplazará a los demás serotipos. Esto se traducirá en predominio del serotipo más competente e incremento del número de casos durante el siguiente año.

Tabla 13. Razón de tasas de incidencia (RTI) de dengue por índice Shannon durante los años 2000-2010.

Índice Shannon (por 0.1)	RTI Cruda (IC95%)	RTI Ajustada* (IC95%)
Concurrente	1.063 (1.061, 1.067)	1.004 (1.001, 1.007)
Un año antes	1.084 (1.081, 1.087)	1.056 (1.053, 1.059)
Dos años antes	0.974 (0.971, 0.976)	0.947 (0.945, 0.950)

El IS fue calculado con base en las frecuencias relativas de cada serotipo por año (Tabla 10). Los valores de RTI corresponden al incremento observado por cada 0.1 unidades del IS. * Ajustado por año de registro.

Figura 8. Relación temporal entre el índice Shannon e incidencia de dengue durante los años 2000-2010.



El IS fue calculado con base en las frecuencias relativas de cada serotipo por año (Tabla 10), Rango IS=0-1.34, donde 0 equivale a frecuencia relativa para un serotipo igual al 100%, y 1.34 equivale a frecuencias relativas iguales entre los diferentes serotipos (25% cada uno). Las tasas de incidencia para los casos de dengue en el AMB fueron calculadas con base en la información de casos de dengue y total de población en el AMB por año (Tabla 8).

7.3 RELACION ENTRE PRESENCIA DE DENV-3 Y FRECUENCIA DE INFECCION PRIMARIA Y SECUNDARIA

7.3.1 Anticuerpos IgG en los sueros incluidos en el estudio. Se procesaron un total de 254 sueros agudos de sujetos con diagnóstico confirmado de dengue por ELISA IgG con el propósito de robustecer la información de tipo de infección disponible para el periodo 2007-2010. Para este periodo, el 64% (n=162) de las muestra procesadas fueron infección primaria y el 36% (n=92) secundarias. La Tabla 14 detalla la frecuencia de infecciones por año.

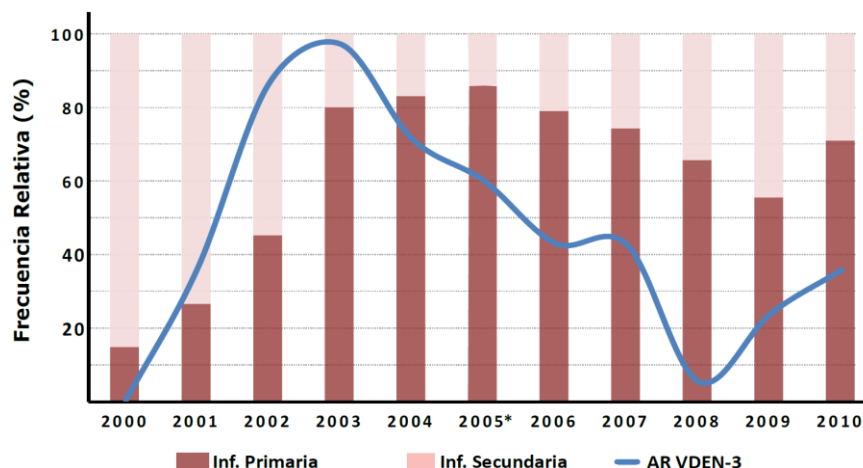
Tabla 14. Frecuencia de infección primaria y secundaria en las muestras del periodo 2007-2010 procesadas en el presente trabajo

AÑO	Total de Muestra	Infeccion Primaria n(%)	Infeccion Secundaria n(%)
2007	50	34 (68%)	16 (32%)
2008	30	20 (67%)	10 (33%)
2009	74	38 (51%)	36 (49%)
2010	100	70 (70%)	30 (30%)

7.3.2 *Relacion de DENV-3 y tipo de infección.* El 62% de las infecciones (n=715) durante el periodo 2000-2010 fueron primarias, y el 38% restantes (n=433) secundarias. La frecuencia de infecciones primarias y secundarias presentó un comportamiento diferencial en el tiempo. Durante el período 2001-2004 la frecuencia de infecciones primarias aumentó progresivamente con relación al año 2000 (15%, 27%, 45%, 80% y 83%, respectivamente), lo que coincidió con el periodo de abundancia de DENV-3 (Figura 9). Para el periodo 2006-2009 se evidenció una disminución progresiva (79%, 74%, 66%, 56%), que también coincidió con una disminución en la abundancia del serotipo. Finalmente, en el año 2010 se observó un nuevo aumento en la frecuencia de infecciones primarias (71%) paralelo al resurgimiento y predominio de DENV-3.

Al evaluar la correlación entre frecuencia de infecciones primarias y abundancia de DENV-3 superior o inferior al 50%, encontramos que la proporción de infección primaria era 94% mayor en los años en donde la abundancia relativa de DENV-3 fue superior al 50%, comparado con aquellos en que fue inferior al 50%, independientemente del año (razón de incidencia, RI: 1.94, IC95%: 1.56 - 2.41); es decir que durante los años con una abundancia relativa de DENV-3 superior al 50% se duplicó la incidencia de infecciones primarias.

Figura 9. Relación entre abundancia relativa de DENV3 y el tipo de infección durante los años 2000-2010.



7.3.3 *Relación entre serotipo y tipo de infección.* Al evaluar la asociación entre el serotipo infectante y el tipo de infección, encontramos una distribución diferencial del tipo de infección entre los serotipos (Tabla 15). Se observó una mayor proporción de casos de infección primaria causadas por serotipos DENV-3 y DENV-1, mientras que las infecciones secundarias fueron atribuidas principalmente a los serotipos DENV-2 y DENV-4. En el análisis multivariado, ajustando por la edad del sujeto y el año de registro, ninguno de los serotipos se asoció estadísticamente al tipo de infección (Tabla 16).

Tabla 15. Asociación entre serotipos y tipo de infección para el total de muestras evaluadas entre 2000-2010.

Serotipo	Total (n=248)	Primaria (n=176)	Secundaria (n=72)	p*
DENV-1	56 (22.6)	48 (27.3)	8 (11.1)	<0.001
DENV-2	40 (16.1)	15 (8.5)	25 (34.7)	
DENV-3	118 (47.6)	95 (54.0)	23 (31.9)	
DENV-4	34 (13.7)	18 (10.2)	16 (22.3)	

* Prueba Chi cuadrado de Pearson (grados de libertad=3).

Tabla 16. Asociación entre serotipo de DENV y tipo infección (primaria versus secundaria) durante los años 2000-2010.

Serotipo	OR Crudo (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
DENV-1	Referente	Referente
DENV-2	0.10 (0.04, 0.27)	0.34 (0.04, 2.81)
DENV-3	0.69 (0.27, 1.65)	0.46 (0.14, 1.56)
DENV-4	0.19 (0.07, 0.51)	0.34 (0.09, 1.24)

* Ajustado por edad y año de registro.

7.4 DIVERSIDAD GENÉTICA DE DENV-3.

El gen E de 27 cepas de DENV-3 aisladas durante el periodo de 2001 a 2010 en el AMB de Santander fue secuenciado y alineado con otras secuencias representativas de DENV-3 disponibles en GenBank para su posterior análisis filogenético. Se realizó un análisis preliminar de 184 secuencias del gen E de DENV-3 que incluyó secuencias de los cinco genotipos de DENV-3 de acuerdo a lo definido por Wittke y cols (Wittke et al. 2002). Las secuencias idénticas o

cercanamente relacionadas a otras fueron excluidas del análisis final, obteniéndose un dataset final de 163 secuencias de DENV-3 de aislados obtenidos en diferentes países y diferentes años (1956-2010).

Todas las cepas de DENV-3 de Santander, y en general de Colombia se ubicaron dentro del Genotipo III. No se encontraron secuencias de genotipo V (también llamado genotipo I) como lo había reportado previamente Usme y Cols (Usme-Ciro et al. 2008) en un análisis de un segmento corto del extremo 3' del gen de la envoltura, dichas secuencias son casi idénticas a la de las cepa de referencia H87 de filipinas, razón por la cual podría tratarse de una contaminación con la cepa prototipo (Figura 10).

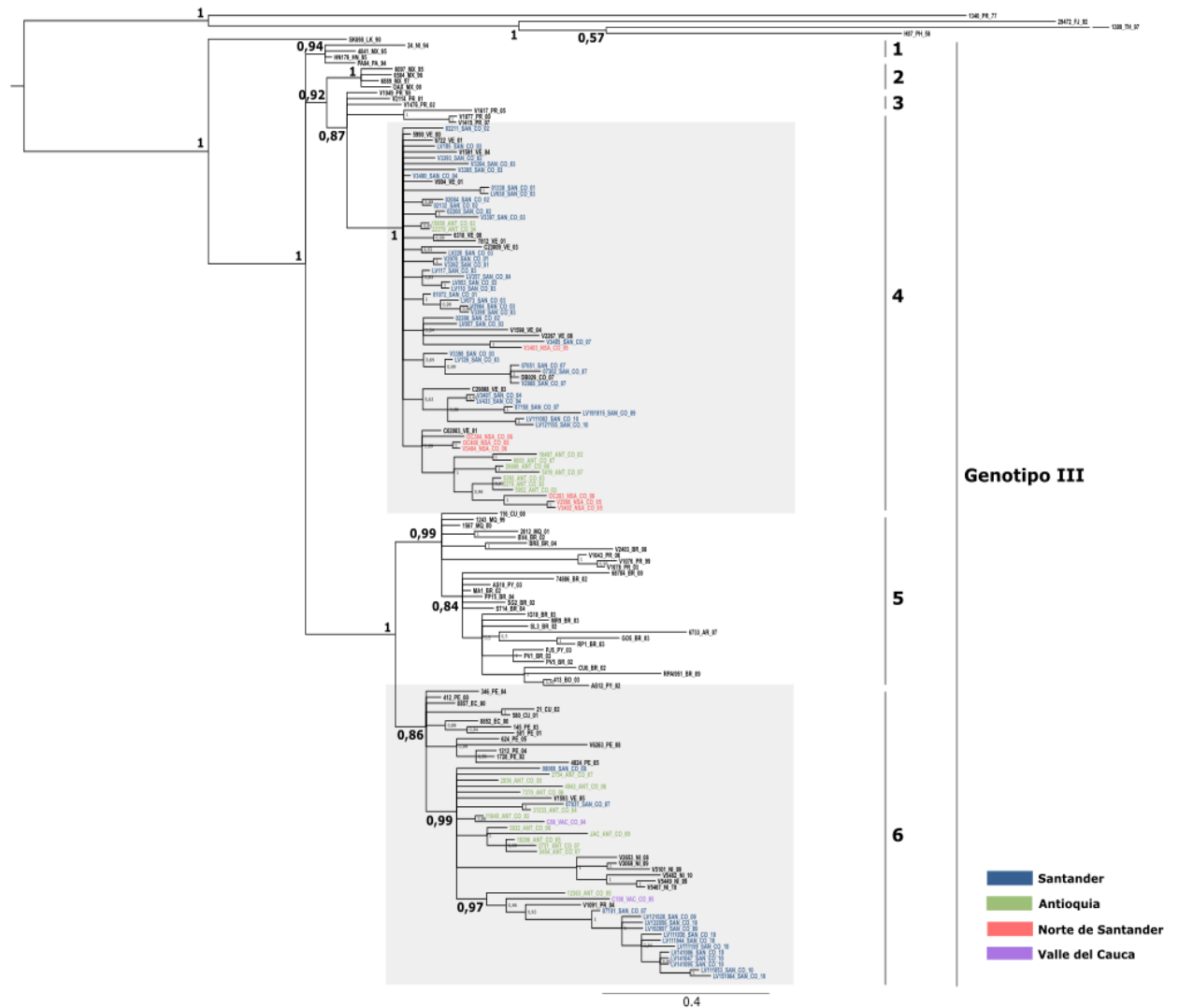
Las cepas americanas de DENV-3 evaluadas en el presente estudio se subdividieron en seis grupos que, de acuerdo a su procedencia se distribuyeron de la siguiente manera: Nicaragua/México/Panamá/Honduras (1) que corresponde a aislados tempranos (1994-1996) después de la introducción del serotipo en Centroamérica, México (2), Puerto Rico (3), Venezuela (4), Brasil/Cuba/Martinica (5), y Ecuador/Perú (6). Estos grupos constituyen linajes monofiléticos con soportes de rama que van entre 0,88 y 1, excepto las secuencias de Puerto Rico que aparecen como grupo polifilético.

Las cepas de Santander y en general las cepas Colombianas se ubicaron en los grupos 4 y 6. El linaje 4 corresponde a la introducción que se observó por primera vez en Venezuela en el año 2000 (Araújo et al. 2009); en este linaje se encuentran todas las cepas Santandereanas aisladas durante el periodo 2001-2004 y la mayoría de cepas aisladas durante 2007. Durante este periodo se evidencia múltiples intercambios de cepas entre Venezuela y los departamentos de Santander, Norte de Santander y Antioquia, demostrado por la presencia de múltiples clados con cepas de los dos países dentro de este linaje. A partir del año

2007 se detectan además en Santander cepas del grupo 6 que corresponde al linaje introducido en Ecuador en 1999, para las cuales se dieron aparentemente al menos tres introducciones recientes de este linaje a Santander, convirtiéndose a partir de 2008 en el linaje predominante en este departamento. La presencia del linaje ecuatoriano en Santander en 2007 coincidió con descenso de la abundancia relativa de DENV-3 en la localidad, y el predominio de este linaje en 2010 coincidió a su vez con el nuevo incremento de DENV-3 en el AMB.

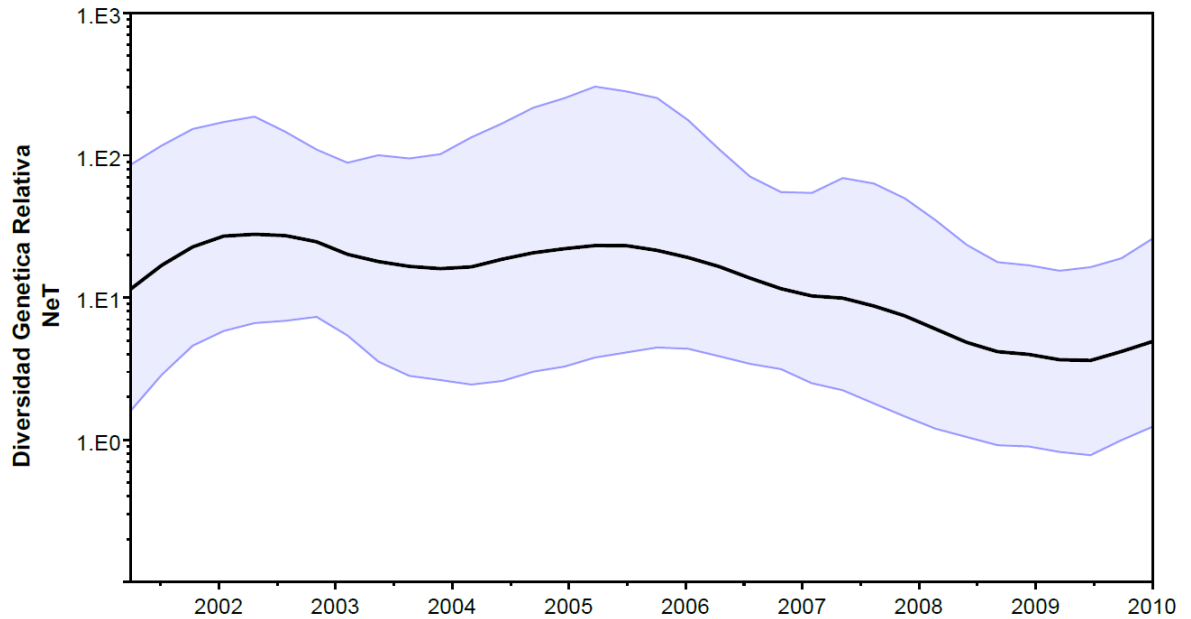
Se investigó la variación en la diversidad genética en un contexto de coalescencia para dilucidar cómo ha cambiado la población viral DENV-3 en Santander (Figura 11). Desde el 2001, la diversidad genética de la población viral mostró un incremento que coincidió con la re-emergencia del virus en la región y su expansión, llegando a su punto máximo entre 2002-2003, cuando el 92% de los casos reportados en Santander fueron ocasionados por este serotipo (Figura 7). A partir de 2005 la diversidad genética de la población mostró un descenso progresivo, siendo su punto más bajo entre 2008-2009, periodo en el cual se dio la circulación simultanea de los dos linajes y el reemplazo del linaje predominante; esto además coincidió con el periodo de menor abundancia relativa de DENV-3. En el año 2010 se observó un leve incremento de la diversidad genética de la población viral, que a su vez coincidió con la expansión y predominio del linaje ecuatoriano en la región y la reemergencia de DENV-3 en términos de abundancia relativa.

Figura 10. Árbol consenso por mayoría de las secuencias de DENV-3 estimado por inferencia bayesiana con el programa MrBayes v3.2.5.



Las secuencias de Colombia se muestran en color de acuerdo al lugar de aislamiento: azul= Santander, verde= Antioquia, rosa= Norte de Santander, lila= Valle del Cauca. Los números cerca de los nodos son probabilidades posteriores para el clado correspondiente. Los linajes definidos en este estudio para el genotipo III se señalan con números arábigos. Los recuadros grises resaltan los linajes en donde se ubicaron las secuencias Colombianas. El árbol fue dibujado con el programa FigTree v1.4.2 y editado en el programa Inkscape v0.9.

Figura 11. Diversidad genética de la población viral de DENV-3 que circuló en Santander durante los años 2001-2010.



El “Bayesian Skygrid plot” muestra los cambios relativos el tamaño efectivo de la población a través del tiempo (NeT). NeT , es el producto del tamaño efectivo de la población y la duración de la generación en el año (diversidad genética relativa); línea negra=mediana; sombra azul= 95% de densidad de probabilidad.

8. DISCUSION

El propósito de este estudio fue aportar información adicional a la ya disponible sobre abundancia relativa de los serotipos del dengue en el tiempo, tipo de infección (primaria o secundaria) de los casos de dengue y genética de la población de DENV-3 en el AMB, que pueda servir para robustecer estudios epidemiológicos enfocados a identificar factores que modulan la transmisión del dengue en el país. Así mismo, se analizó la relación entre DENV-3 y la co-circulación de los serotipos con el patrón epidemiológico del dengue (tasa de incidencia). En consideración a la complejidad de la epidemiología del dengue no se pretendió establecer relaciones causales, pero sí mostrar correlaciones y coincidencias entre las diferentes variables evaluadas.

Hallazgo 1: la relación entre abundancia de DENV-3 relativa a los otros serotipos en el AMB.

En relación a la abundancia de DENV-3 relativa a los otros serotipos se encontró que DENV-3 fue el serotipo más abundante (45%) del periodo, seguido en frecuencia por DENV-1, DENV-2 y DENV-4. La abundancia de DENV-3 fluctuó en el tiempo y estas fluctuaciones a su vez coincidieron con cambios en la abundancia de los demás serotipos. El periodo de mayor abundancia de DENV-3 (2002-2004) y resurgimiento (2009-2010) coincidió con escasez de DENV-2 y DENV-1 respectivamente, y el periodo de escasez (2008) con incremento del DENV-1. Esto se evidenció por una predominancia en fases de los serotipos que siguió la secuencia 2/3/1. Fluctuaciones en la abundancia de los serotipos con predominio de uno de ellos por un período de tiempo seguido de reemplazo por otro serotipo, han sido informadas también en otros países del continente Americano como Nicaragua (Gordon et al. 2013), Perú (Morrison et al. 2010),

Puerto Rico (Santiago et al. 2012) y México (Farfa 2014). Estas fluctuaciones características de los serotipos del dengue permiten suponer la existencia de una posible interacción entre ellos.

Con el propósito de evaluar la relación entre DENV-3 y los otros serotipos, se realizó un análisis de correlación entre los cambios en la abundancia relativa del DENV-3 y los cambios en las abundancias relativas de los demás serotipos en función del tiempo. Los resultados de este análisis mostraron una correlación negativa entre la presencia de DENV-3 y la presencia de los otros serotipos. Correlaciones similares se observaron también entre DENV-1 y DENV-2, y entre DENV-2 y DENV-4. Sin embargo, ninguna de las correlaciones encontradas tuvo significancia estadística, probablemente debido a un tamaño de muestra anual de aislados relativamente pequeño que no permitió ver la significancia de la tendencia observada entre los serotipos. No obstante, los datos sugieren que la presencia de DENV-3 podría tener un efecto reductor sobre los demás serotipos dado que la abundancia del DENV-3 en el AMB coincidió con disminución de los demás serotipos. Esto ha sido observado también en Nicaragua (Gordon et al. 2013), Perú (Morrison et al. 2010), Puerto Rico (Santiago et al. 2012), México (Farfa 2014) y Tailandia (Zhang et al. 2005). Una posible explicación de este efecto reductor entre los serotipos podría ser la existencia de diferencias en la capacidad de transmisión (fitness) entre los mismos. Al respecto, un estudio *in vitro* con DENV-2 y DENV-4 evidenció un fenómeno de competencia asimétrica entre los serotipos, en donde DENV-2 mostró una mayor competencia en co-cultivo desplazando el crecimiento de DENV-4 (Pepin et al. 2008). Otro estudio en modelo animal que comparaba la capacidad de aislados clínicos de DENV para infectar ratones inmunocompetentes encontró que independiente de la estrategia de infección utilizada, la cepa de DENV-3 (D3/BR/SL3/08) mostró una mayor capacidad de infección (ARN del virus fue detectado con mayor frecuencia en el suero y en varios órganos) en el modelo experimental en comparación con la cepa

de DENV-2 (D2/BR/RP/RMB/09) y una cepa de DENV-1 adaptada en el laboratorio (cepa Mochizuki) (Barros et al. 2015).

Así mismo, es importante considerar que la dinámica de circulación fluctuante de los serotipos es un fenómeno complejo y por lo mismo difícil de analizar y que otros factores como la inmunidad cruzada de corta duración y la diversidad genética del virus podrían estar contribuyendo también a la dinámica de circulación de los serotipos observada en el AMB.

Hallazgo 2: la relación entre abundancia relativa de DENV-3 e infección primaria

En relación a la asociación entre frecuencia de infecciones primarias o secundarias por dengue y abundancia de DENV-3 se encontró que el periodo de predominio de DENV-3 se correlacionó con incremento casi del doble (94%) en la incidencia de infecciones primarias. Este hallazgo llama la atención pues con la reintroducción de DENV-3 al AMB se esperaba observar un incremento de las infecciones secundarias, debido a que 3 de los serotipos del virus habían circulado de forma endémica en la localidad por varios años y una proporción importante de la población probablemente ya había sido expuesta al menos a uno de ellos. No obstante, el hecho de que el periodo de predominio de DENV-3 se correlacionó con un incremento de infecciones primarias sugiere que la presencia de inmunidad en la población hacia cualquiera de los serotipos protege de manera cruzada contra el desarrollo de infecciones sintomáticas por DENV-3.

Al respecto, en las cohortes de dengue de Nicaragua (Gordon et al. 2013) y Perú (Morrison et al. 2010), dos localidades igualmente endémicas, se ha encontrado que las infecciones secundarias que ocurren en un intervalo corto de tiempo entre la infección primaria y secundaria (2.5 años) se encuentran asociadas al desarrollo de infección asintomática lo que se ha atribuido a la presencia de inmunidad

heterotípica protectora. Esto favorece la hipótesis de que la presencia de inmunidad heterotípica podría ser determinante en la dinámica de circulación de los serotipos del DENV, en donde el nivel de protección cruzada (neutralización) dependería entre otros factores del nivel de anticuerpos del huésped, la secuencia de las infecciones y el intervalo entre las mismas. Estudios de modelamiento que evalúan la interacción entre la inmunidad y la dinámica de circulación de los serotipos soportan esta hipótesis (Adams et al. 2006; Recker et al. 2009).

Hallazgo 3: la relación entre abundancia relativa de DENV-3 y diversidad genética de la población viral.

Sobre las relaciones filogenéticas de las cepas de DENV-3 se encontró que todas las cepas Colombianas analizadas en el presente estudio agruparon en el genotipo III, más cerca de virus de países fronterizos (Venezuela, Ecuador, Perú) que de otros de Suramérica (Brasil, Paraguay, Argentina) y de Centroamérica (México, Nicaragua, Puerto Rico, Honduras, Panamá). Así mismo se pudo confirmar la co-circulación de dos linajes (venezolano y ecuatoriano) del genotipo en el AMB de Santander a partir de 2007. Estos resultados son consistente con lo informado previamente por *Villabona y Col* (Villabona-Arenas et al. 2009) y *Ospina y Col* (Ospina et al. 2010) para DENV-3 de Colombia y con otros trabajos de DENV-3 de América (de Mora et al. 2009; Alfonso et al. 2012; Schmidt et al. 2011).

Al evaluar los cambios en el tiempo de la diversidad genética relativa de la población de DENV-3 de Santander y su posible asociación con cambios en la abundancia del serotipo, se encontró que el incremento de la diversidad de DENV-3 coincidió con la re-introducción del virus en la localidad y su expansión (2002-2003). Así mismo, el descenso de la diversidad a partir de 2005 coincidió con la disminución progresiva de la abundancia relativa de DENV-3. La menor diversidad de DENV-3 observada entre 2007-2008 coincidió a su vez con la detección del

linaje ecuatoriano (grupo 6, Figura 10) en Santander y con un descenso marcado en la abundancia relativa de DENV-3 en la localidad. Finalmente, en 2009-2010 el predominio del linaje ecuatoriano y la evidencia de evolución *in situ* en este linaje coincidieron con el nuevo incremento de DENV-3 en el AMB. Estos resultados sugieren que los cambios de abundancia de DENV-3 podrían haber contribuido a la diversificación genética del virus observada en el AMB. Cambios de linaje del DENV-3 asociados a cambios en la abundancia del serotipo se han documentado también en Tailandia (Zhang et al. 2005), Puerto Rico (Santiago et al. 2012) y Brasil (de Araújo et al. 2012). Hallazgos similares a su vez se han informado también para DENV-1 de Santander por *Ocazonez y Col* en estudio previo (Ocazonez-jiménez et al. 2013).

Hallazgo 4: la relación entre abundancia relativa de DENV-3 e incidencia del dengue en el AMB.

Al evaluar la relación entre DENV-3 y el patrón epidemiológico del dengue se encontró que el predominio de DENV-3 superior al 50% se asoció con incremento de la incidencia de casos de dengue en el AMB. Dicho predominio del serotipo se observó en el periodo 2002-2005. Al igual que en el AMB, la reintroducción de DENV-3 y subsecuente predominio en otros países latinoamericanos coincidió con incremento significativo del número de casos de dengue (Santiago et al. 2012; Morrison et al. 2010; Guzmán et al. 1996). Esto ha sido atribuido a que gran mayoría de la población era susceptible al serotipo (ausencia de inmunidad específica) lo que pudo haber favorecido su expansión y predominio. Así mismo, la disminución del número de individuos susceptibles podría ser uno de los factores que explique la disminución progresiva en la abundancia de DENV-3 observada en el AMB entre 2006-2008.

Hallazgo 5: la relación entre diversidad de DENV e incidencia del dengue en el AMB.

La circulación simultanea de los cuatro serotipos durante 2010 y el hecho de que tres de ellos (DENV-1-3-4) exhibieran abundancias similares permite suponer que en áreas hiperendémicas, el comportamiento de la enfermedad no puede ser explicado de manera independiente por un serotipo sino por la interacción entre todos ellos. Esto es soportado por los resultados obtenidos durante la evaluación de la asociación entre la co-circulación de los serotipos de DENV en términos de su diversidad en el tiempo (IS, índice de Shannon) y la incidencia del dengue en el AMB, en donde el incremento de 0.1 unidades del IS se asoció con incremento en 6,3% y 8.4% de la incidencia del dengue al evaluarse de manera concurrente y con un año de retraso, respectivamente. Estos hallazgos permiten a su vez validar lo informado por *Recker y Cols* en 2009 (Recker et al. 2009), durante la evaluación de la correlación entre valores estimados para la co-circulación de los serotipos del DENV y la incidencia de la enfermedad a través de un modelo matemático simple que buscaba investigar la dinámica de transmisión de los serotipos del DENV en el sur de Viet Nam para un periodo de 50 años. En este estudio se encontró una correlación positiva entre las fluctuaciones de la prevalencia de la enfermedad y las fluctuaciones de la diversidad de los serotipos, siendo esta más pronunciada cuando se evaluaba con desfase entre los dos parámetros (no concurrentes). Estos resultados permiten suponer que las variaciones temporales en la abundancia de los serotipos podrían ser útiles para el desarrollo de modelos de predicción de brotes o epidemias de la enfermedad en la región. No obstante, es importante considerar que el periodo evaluado es corto y que la re-introducción de DENV-3 al inicio de la ventana de observación pudo haber modificado la dinámica de circulación de los serotipos en Santander, por lo que es conveniente el validar estos hallazgos en estudios posteriores que incluyan un periodo más amplio. Para ello se requiere de una vigilancia virológica sistemática, efectiva y

mantenida en el tiempo con el objeto de poder identificar variaciones en la abundancia de los serotipos de forma oportuna.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo confirmar que el DENV-3 continuo circulando en el AMB luego de 2008. No se encontró correlación entre la abundancia de DENV-3 y la abundancia de los demás serotipos. El periodo de abundancia de DENV-3 se asoció con incremento de infecciones primarias. Sin embargo, no se encontró asociación entre el DENV-3, ni los demás serotipos con el tipo de infección. Cambios en la diversidad de la población de DENV-3 de Santander coincidió con introducción y re-emplazo de linajes del serotipos y con cambios en su abundancia.

El predominio del serotipo durante los años siguientes a su re-introducción en Santander se asoció con incremento considerable de la tasa de incidencia del dengue en la localidad. Adicionalmente, un incremento en la diversidad de los serotipos dada por co-circulación de los cuatro en proporciones similares se asoció con incremento de la tasa de incidencia.

10.FORTALEZAS DEL ESTUDIO

El presente estudio permitió llenar vacíos de conocimiento existentes en la vigilancia virológica realizada en la localidad de estudio gracias al trabajo cooperativo.

El muestreo proveniente de estudios de cohorte fue una ventaja en la evaluación de la abundancia relativa de DENV pues refleja de manera más cercana lo que puede estar ocurriendo en la población sintomática.

Se pudo obtener nueva información de calidad para el periodo 2009-2010, así como acceder a información secundaria para los periodos 2001-2004 y 2006-2008 sobre predominancia relativa de los serotipos e inmunidad poblacional. Así mismo, se obtuvo nueva información genética sobre DENV-3 la cual será útil durante el desarrollo de futuros estudios biogeográficos y filogenéticos del serotipo en la región.

11. DEBILIDADES DEL ESTUDIO

No fue posible obtener información del año 2005 para las variables de estudio, razón por la cual fue necesario inferir el comportamiento de las variables de estudio para este año y esto podría haber afectado la confiabilidad de los resultados.

De igual manera la ventana de observación evaluada y el tamaño de muestra para cada año podrían ser insuficientes para dilucidar el tipo de interacción existente entre los diferentes serotipo. Además, la re-introducción de DENV-3 al inicio de la ventana de observación pudo haber modificado la dinámica de circulación de los serotipos en Santander, por lo que es conveniente el validar estos hallazgos en estudios posteriores que incluyan un periodo más amplio.

El tipo de muestreo empleado en los diferentes años para obtener los datos de abundancia de los serotipos de DENV en la localidad también podría influir en los hallazgos, pues para los años 2000-2002 y 2007-2008 la información virológica se obtuvo a través de muestras captadas durante la vigilancia realizada por el laboratorio departamental de salud pública porque no se estaban llevando a cabo estudios de cohorte.

12.RECOMENDACIONES

Los datos presentados en este estudio muestran la necesidad de desarrollar estudios bien conducidos para profundizar en el conocimiento de la relación entre la dinámica de circulación de los serotipos y el patrón epidemiológico del dengue en Santander, y en general Colombia. Por otra parte muestran la necesidad de desarrollar una vigilancia virológica sistemática, efectiva y mantenida en el tiempo, que incluya además de la identificación de variaciones en la abundancia de los serotipos de forma oportuna, estudios filogenéticos de los genotipos o linajes circulantes tanto de DENV-3 como de los otros serotipos y estudios biogeográficos que permitan establecer posibles rutas de dispersión del virus dentro del país. Así como el desarrollo de modelos de predicción de brotes o epidemias que contemplen el aporte de las fluctuaciones de los serotipos y los cambios genéticos de la población viral en el tiempo como parte del modelo.

13.DIVULGACION Y FUENTES DE FINANCIACION

Este trabajo fue financiado por la Gobernación de Santander - Sistema General de Regalías, a través del convenio especial de cooperación 5246 de 2013; la compañía farmacéutica Sanofi Pasteur (Francia); y el Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas (COLCIENCIAS), a través del proyecto: “Factores de riesgo asociados a mortalidad por dengue en adultos y niños durante una epidemia en áreas endémicas de Colombia”, código 110256934490 contrato 606-2013.

Resultados del mismo fueron presentados en el 14vo. Curso Internacional de Dengue, organizado por el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, la PAHO/WHO y demás instituciones, a través del trabajo titulado: “Asociación entre co-circulación de serotipos del virus Dengue e incidencia de la enfermedad en un área endémica Colombiana”, en modalidad de poster.

BIBLIOGRAFIA

Adams, B. et al., 2006. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *PNAS*, 103(38), pp.14234–9.

Alfonso, H.L. et al., 2012. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virology journal*, 9, p.124.

Araújo, J.M.G. et al., 2009. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*, 9(4), pp.716–25.

De Araújo, J.M.G. et al., 2012. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(9), p.e1784.

Barros, V.E. et al., 2015. Differential replicative ability of clinical dengue virus isolates in an immunocompetent C57BL/6 mouse model. *BMC microbiology*, 15, p.189.

Bello, S. et al., 2011. Medición del impacto económico del dengue en Colombia: una aproximación a los costos médicos directos en el periodo 2000-2010. *Biomedica*, 31(sup.3), pp.110–2.

Boshell, J. et al., 1986. Dengue en colombia. *Biomedica*, 6(2), pp.2–7.

Brandt, W., 1990. From the World Health Organization. Development of dengue and Japanese encephalitis vaccines. *J Infect Dis*, 162(3), pp.577–83.

Brathwaite Dick, O. et al., 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*, 87(4), pp.584–93.

Capeding, M.R. et al., 2014. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 384(9951), pp.1358–1365.

Castañeda-Orjuela, C. et al., 2012. Burden of Disease and Economic Impact of Dengue and Severe Dengue in Colombia, 2011. *Value Health*, 1(2), pp.123–128.

Centers for Disease Control, C., 1995. Dengue type 3 infection-Nicaragua and Panama, October-November,1994. *MMWR*, 44, pp.21–4.

Cortés, F.M., Gómez, S.Y. & Ocazonez, R.E., 2007. Subtipos de virus dengue serotipos 2, 3 y 4 aislados en el Departamento de Santander, Colombia. *Rev Cubana Med Trop*, 59(3), pp.186–92.

Craig, S. et al., 2003. Diverse Dengue Type 2 Virus Populations Contain Recombinant and Both Parental Viruses in a Single Mosquito Host. *J Virol*, 77(7), pp.4463–7.

Dash, P.K. et al., 2006. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS. *Virology journal*, 3, p.55.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística - DANE, 2015. *Proyecciones de Población departamentales y municipales por área 2005-2020*,

Endy, T.P. et al., 2004. Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. , 01655(Dv), pp.990–1000.

Farfa, A., 2014. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Mexico (2000 – 2011): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(11).

Gómez, S. y et al., 2008. Dengue virus serotype 3 (genotype III) from Colombia: A perspective of its pathogenic potential. *Dengue bulletin*, 32, pp.126–37.

Gordon, A. et al., 2013. The Nicaraguan pediatric dengue cohort study: incidence of inapparent and symptomatic dengue virus infections, 2004-2010. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), p.e2462.

Gubler, D. & Meltzer, M., 1999. Impact on the dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res*, 53, pp.35–70.

Gubler, D.J., 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. , 11(3), pp.480–496.

Guzmán, M. et al., 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol of Sanit Panam*, 121(2), pp.102–10.

Guzman, M.G. et al., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, 8(12), pp.S7–16.

Guzman, M.G., Alvarez, M. & Halstead, S.B., 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*, 158(7), pp.1445–59.

Holmes, E., 2006. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp.*, 277, pp.177–87; discussion 187–92, 251–3.

Holmes, E. & Twiddy, S., 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 3(1), pp.19–28.

Holmes, E.C., 2003. Patterns of Intra- and Interhost Nonsynonymous Variation Reveal Strong Purifying Selection in Dengue Virus. *J Virol*, 77(20), pp.1–4.

Instituto Nacional de Salud, S. de V.S.P. (SIVIGILA)., 2010. *Boletín de Vigilancia Epidemia por Dengue en Colombia. Boletín 48*,

Klungthong, C. et al., 2008. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*, 154(1-2), pp.175–81.

Klungthong, C. et al., 2004. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*, 329(1), pp.168–79.

Kouri, G., Guzman, M.G. & Bravo, J., 1986. Dengue hemorragico en cuba: Cronica de una epidemia. *Bol of Sanit Panam*, 100(3), pp.322–9.

Lanciotti, R.S. et al., 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, 75(1), pp.65–75.

Liang, H. et al., 2013. Re-emergence of dengue virus type 3 in Canton, China, 2009-2010, associated with multiple introductions through different geographical routes. *PloS One*, 8(2), p.e55353.

Liebman, K. a et al., 2012. Spatial dimensions of dengue virus transmission across interepidemic and epidemic periods in Iquitos, Peru (1999-2003). *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), p.e1472.

Ministerio de Salud y Protección Social & Instituto Nacional de Salud, 2002. *Vigilancia virológica del dengue en Colombia 2002*,

Montoya, M. et al., 2013. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), p.e2357.

De Mora, D. et al., 2009. Evidence of diversification of dengue virus type 3 genotype III in the South American region. *Arch Virol*, 154(4), pp.699–707.

Morrison, A.C. et al., 2010. Epidemiology of dengue virus in Iquitos, Peru 1999 to 2005: interepidemic and epidemic patterns of transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5), p.e670.

Nogueira, M.B. et al., 2008. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(5), pp.483–8.

Nogueira, R.M. et al., 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(7), pp.925–6.

Nogueira, R.M.R. et al., 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*, 11(9), pp.1376–81.

Ocazonez, R.E., 2007. Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Rev salud pública*, 9(2), pp.262–274.

Ocazonez, R.E. et al., 2006. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3

associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(7), pp.725–31.

Ocazonez-jiménez, R.E. et al., 2013. Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander. *Biomedica*, 33, pp.22–30.

Organizacion Mundial de la Salud, O. & Organizacion Panamericana de la Salud, O., 2009. *Dengue, Guia para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*, La paz, Bolivia.

Ospina, M.C., Diaz, F.J. & Osorio, J.E., 2010. Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 83(3), pp.672–8.

Padilla, J., Rojas, D. & Sáenz, R., 2012. *Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. Primera., Bogotá.

Pan American Health Organization, W.H.O., 2010. *Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Figures for 2010 (to week noted by each country)*. *Epidemiological Week/EW* 49,

Pepin, K.M., Lambeth, K. & Hanley, K. a, 2008. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC microbiology*, 8, p.28.

Perera, R. & Kuhn, R.J., 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11(4), pp.369–77.

Pinheiro, F. & Corber, S., 1997. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*, 50, pp.161–9.

Pla, L., 2006. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), pp.1–12.

Podder, G. et al., 2006. Short report: origin of Dengue Type 3 Viruses associated with the dengue outbreak in dhaka, bangladesh, in 2000 and 2001. *Am J Trop Med Hyg*, 74(2), pp.263–265.

Prieto, S. et al., 2013. Dinámica de la epidemia del dengue en colombia: predicciones de la trayectoria de la epidemia. *Revista Med*, 21(1), pp.38–45.

Recker, M. et al., 2009. Immunological serotype interactions and their effect on the epidemiological pattern of dengue. *Proc R Soc B*, 276(1667), pp.2541–8.

San Martín, J.L. et al., 2010. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*, 82(1), pp.128–35.

Santiago, G. a et al., 2013. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), p.e2311.

Santiago, G. a et al., 2012. Reemergence and decline of dengue virus serotype 3 in Puerto Rico. *J Infect Dis*, 206(6), pp.893–901.

Schmidt, D. et al., 2011. A phylogenetic analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals novel NS5 mutation. *Infect Genet Evol*, 11(8), pp.2011–2019.

Shepard, D.S. et al., 2011. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*, 84(2), pp.200–7.

Twiddy, S.S., Holmes, E.C. & Rambaut, A., 2003. Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Mol Biol Evol*, 20(1), pp.122–129.

Twiddy, S.S., Woelk, C.H. & Holmes, E.C., 2002. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J Gen Virol*, 83(Pt 7), pp.1679–89.

Ubol, S. & Halstead, S.B., 2010. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 17(12), pp.1829–35.

Usme-Ciro, J. a et al., 2008. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. *Virology journal*, 5, p.101.

Usme-Ciro, J. a et al., 2014. The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(9), pp.2674–8.

Uzcategui, N.Y., 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol*, 84(6), pp.1569–1575.

Villabona-Arenas, C.J., Miranda-Esquivel, D.R. & Ocazonez, R.E., 2009. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Tropical medicine & international health*, 14(10), pp.1241–50.

Villar, L.A. et al., 2015. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review O. Horstick, ed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), p.e0003499.

Villar, L.Á. et al., 2013. Safety and immunogenicity of a recombinant tetravalent dengue vaccine in 9-16 year olds: a randomized, controlled, phase II trial in Latin America. *Pediatr Infect Dis J*, 32(10), pp.1102–9.

Weaver, S.C. & Vasilakis, N., 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 9(4), pp.523–40.

Wittke, V. et al., 2002. Extinction and Rapid Emergence of Strains of Dengue 3 Virus during an Interepidemic Period. *Virology*, 301(1), pp.148–156.

Zhang, C. et al., 2005. Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence †. *J Virol*, 79(24), pp.15123–15130.

ANEXO 1: Aprobación Comité de Ética – Proyecto “Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue”



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Bucaramanga, mayo 22 de 2006

LA COORDINADORA DEL COMITÉ DE ÉTICA
DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD
INDUSTRIAL DE SANTANDER Y EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SANTANDER

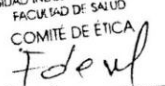
CERTIFICA QUE:

El Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander – UIS y la Empresa Social del Estado Hospital Universitario de Santander – HUS, se reunió con carácter extraordinario los días 8, 9, 15, 16 y 22 de mayo del presente año, con el fin de evaluar los proyectos que serán presentados a las convocatorias 343, 344 y 345 de COLCIENCIAS para el año 2006.

El Comité revisó y analizó el proyecto titulado: “**Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue**”.
Investigador principal: LUIS ANGEL VILLAR CENTENO.

En concepto del Comité de Ética dicho proyecto cumplía con la normatividad vigente desde el punto de vista ético (Resolución 008430/93 expedido por el Ministerio de Salud). Por lo tanto el Comité APROBÓ el proyecto, según consta en el Acta # 10 del 22 de mayo de 2006.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
COMITÉ DE ÉTICA


FLOR DE MARÍA CÁCERES MANRIQUE
Coordinadora Comité de Ética

Ciudad Universitaria - Carrera 27 calle 9
PBX: (7)634 4000 - FAX: (7)635 1946 - A. A. 678 - www.uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

ANEXO 2: Aprobación Comité de Ética – Proyecto “Estudio “AEDES”: Abordando áreas endémicas del dengue para el estudio de su severidad”

**REUNIÓN COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
DE LA FACULTAD DE SALUD UIS**

ACTA N° 14

Fecha: Junio 23 de 2008	Hora: 7:00 a 10:00 A.M.	Lugar: Sala de Reuniones de la DIF
-------------------------	-------------------------	------------------------------------

Asistentes: Esperanza Cruz Solano, Coordinadora Comité de Ética
Luis Carlos Orozco Vargas, Rep. Facultad de Salud
Julio Cesar Mantilla Hernández, Rep. Facultad de Salud
Bertha Lucia Correa Uribe, Rep. Facultad de Salud
Mónica M. Jaramillo Ramírez, Escuela de Filosofía

Ausentes: Olga Lucia Cortés Ferreira, Rep. Facultad de Salud (excusa)
Norberto Anaya, Escuela de Derecho

Orden del Día

- Verificación del quórum
- Lectura y firma de actas anteriores
- Asuntos Proyectos de Investigación

Desarrollo del Orden del Día:

Verificación del Quórum

Asistieron cinco (5) miembros del Comité de Ética

Lectura del acta anterior

Se leyó, aprobó y firmó el acta N° 13/08

Asuntos proyectos de Investigación

Se procede a la revisión de los siguientes proyectos de investigación que participan en la “Convocatoria para la presentación de proyectos de investigación orientada a la solución de problemas prioritarios de salud – año 2008” - 459 de COLCIENCIAS.

- ♦ “Subpoblaciones de células B y su importancia en la patogénesis del Lupus Eritematoso Sistémico”. Investigador principal: Gloria Vásquez. APROBADO.

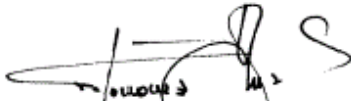
Ciudad Universitaria, Carrera 27 - Calle 9
Apartado Aéreo 678 PBX: (7) 6344000
Bucaramanga, Colombia. www.uis.edu.co

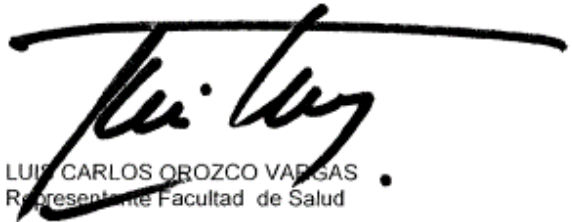


- ♦ **"Caracterización de proteínas inmunomoduladoras presentes en glándulas salivales de *Lutzomyia trapidoi*".** Investigador principal: Gerardo Muñoz. APROBADO.
- ♦ **"Nuevas Estrategias de Bioterapia para la enfermedad diarreica aguda".** Investigador principal: Herman José Arteaga. APROBADO.
- ♦ **"Estudio "AEDES": Abordando áreas endémicas del dengue para el estudio de su severidad".** Investigador principal: Luis Ángel Villar Centeno. APROBADO.
- ♦ **"Diseño, Reproductividad y Validez de instrumentos para medir la exposición dieta en estudio de cáncer en población colombiana".** Investigador principal: Oscar Fernando Herrán Falla. APROBADO.
- ♦ **"Calidad de la dieta, percepción del hambre y seguridad alimentaria en población urbana y rural: estudio multicéntrico de evaluación de tecnología diagnosticada en Cundinamarca, Bogotá, Bucaramanga y su área metropolitana".** Investigador principal: Oscar Fernando Herrán Falla. APROBADO.
- ♦ **"Incidencia y factores asociados a las úlceras por presión en tres instituciones hospitalarias del área metropolitana de Bucaramanga".** Investigador principal: Diana Marina Camargo. APROBADO.
- ♦ **"Análisis experimental de la influencia en el desarrollo normal del recién nacido prematuro de los niveles de intensidad sonora en la unidad de cuidados intensivos neonatal".** Investigador principal: Jaime Enrique Meneses. APROBADO.
- ♦ **"Exposición a mercurio e hipertensión arterial".** Investigador principal: German Gamarra Hernández. APROBADO.
- ♦ **"Ensayo clínico de una intervención psicoterapéutica breve en pacientes con depresión mayor en un Hospital General".** Investigador principal: Marta Isabel Dallos Arenales. APROBADO.
- ♦ **"Evaluación de un algoritmo de manejo para la evaluación y seguimiento ambulatorio del dengue en un área endémica".** Investigador principal: Luis Ángel Villar Centeno. APROBADO.
- ♦ **"Liposomas ultradeformables de paramomicina y miltefosine como potenciadores de la actividad antileishmania. Evaluación en sistema in Vitro".** Investigador principal: Patricia Escobar Rivero. APROBADO.
- ♦ **"Estudio NoTube: No colocación de tubo de tórax al finalizar una resección pulmonar en cuña realizada por toracoscopia asistida por video".** Investigador principal: Luis Carlos Orozco Vargas. APROBADO.
- ♦ **"Calidad de vida y síntomas depresivos en la adherencia al tratamiento antihipertensivo".** Investigador principal: Myriam Orostegui Arenas. APROBADO.

- ♦ **"Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluationN - (VISION) Colombia"**. Investigador principal: Juan Carlos Villar Centeno. APROBADO.
- ♦ **"Estudio de asociación entre el flujo vascular cerebral y la presencia de déficit cognitivo en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (Estudio CASICCA)"**. Investigador principal: Carlos Arturo Conde Cotes. APROBADO.
- ♦ **"Asociación de los polimorfismos: Ser19Trp del gen PPAR-Gamma, SNP276 del gen de la Adiponectina y Trp64Arg del gen del receptor beta 3-Adrenergico con el Síndrome Metabólico en una población de Bucaramanga, Colombia"**. Investigador principal: Gerardo Mantilla. APROBADO.
- ♦ **"Estudio del efecto tóxico de fotosensibilizadores transportados por nanovectores en células infectadas en *Leishmania*"**. Investigador principal: Fernando Martínez Ortega. APROBADO.
- ♦ **"Vulnerabilidad a ITS/VIH/SIDA en hombres en situación de desplazamiento"**. Investigador principal: Sandra Catalina Ochoa Marín. APROBADO.

En constancia firman:


 ESPERANZA CRUZ SOLANO
 Coordinadora Comité de Ética


 LUIS CARLOS OROZCO VARGAS
 Representante Facultad de Salud


 BERTHA LUCÍA CORREA URIBE
 Representante Facultad de Salud


 JULIO CESAR MANTILLA HERNÁNDEZ
 Representante Facultad de Salud

ANEXO 3: Consentimiento Informado – Proyecto “Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue”

Etiología y caracterización clínica del síndrome febril agudo inespecífico en un área urbana colombiana endémica de dengue

**Universidad Industrial de Santander – Instituto Nacional de Salud
The University of Texas Medical Branch**

COLCIENCIAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del participante

Nosotros le entregaremos una copia de este documento. Al firmar este, usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en participar como un sujeto de investigación en este estudio.

Usted está de acuerdo en:

Que debe dar una muestra de sangre, la cual será almacenada y usada en estudios futuros para determinar cuál o cuáles agentes infecciosos causan la fiebre, Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios de factores bioquímicos asociados a la severidad de la enfermedad y permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en otros estudios futuros, incluyendo pruebas genéticas.

¿Acepta Usted participar en este estudio voluntariamente? Si ☐ No ☐

Si Usted ha aceptado participar, por favor escriba su nombre y firma. Si el paciente es un menor de edad (< de 18 años) deberá además firmar uno de los padres.

Nombre del participante: _____

Cédula: _____

Fecha

Firma del participante

Nombre del padre o madre: _____

Cédula de ciudadanía: _____

Firma

Nombre del Testigo: _____

Cédula: _____

Dirección: _____

Relación: _____

Firma _____

Declaración del investigador

Yo certifico que le he explicado a esta persona esta investigación, y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas en forma adecuada.

Nombre del investigador: _____

ANEXO 4: Consentimiento Informado – “Estudio “AEDES”: Abordando áreas endémicas del dengue para el estudio de su severidad”

**Estudio “AEDES”: Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad
UIS, UNIVALLE, UNINORTE, SURCOLOMBIANA, UTMB, UMMS, USP
COLCIENCIAS (V2)**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Antes de que usted decida si va a participar en este estudio, es importante que entienda lo que se hará en él, de manera que usted tenga la información necesaria para tomar esa decisión. Este documento contiene información acerca del estudio; una vez entienda de lo que se trata el estudio, si quiere participar en él se le solicitará que firme este documento. Esto quiere decir que usted es libre de escoger si participa o no en el estudio.

Propósito del estudio

La Fiebre tiene diferentes causas y en nuestro medio el virus del dengue es una de sus principales causas. El dengue es una enfermedad que presenta síntomas y signos muy variados, esto hace que la enfermedad se clasifique como dengue clásico o dengue hemorrágico. Sin embargo, existen otros compromisos generados por el virus, como la inflamación del Hígado (hepatitis), del cerebro (encefalitis) entre otros, que aunque son menos frecuentes son complicaciones importantes. Adicionalmente, algunos síntomas, signos, o proteínas de la sangre de las personas pueden estar relacionados con el Dengue Hemorrágico o con las otras complicaciones, conocer cuáles características podrían servir para identificar tempranamente las personas que se encuentran en riesgo de sufrir dengue severo, orientarían al personal de salud para realizar un manejo priorizado.

Con el fin de conocer cuál es la frecuencia de las manifestaciones severas de dengue e investigar características de los pacientes que predigan severidad, los Grupos de Investigación de las diferentes ciudades de Colombia (Barranquilla, Bucaramanga, Buga, Cali y Neiva), en asociación con las Universidades de Texas, Massachusetts y Sao Paulo, estamos desarrollando este estudio en el que se evaluarán 2000 personas y usted ha sido invitado a participar.

Quiénes pueden participar

Personas con fiebre a quienes el médico les sospecha que tengan dengue y que residan en las ciudades mencionadas. Usted está siendo invitado a participar porque presenta estas condiciones. Usted deberá estar dispuesto a ser entrevistado y examinado durante la próxima semana para conocer como sigue de su enfermedad. Si tiene historia de enfermedades tales como, cáncer, leucemia, VIH positivo o alguna enfermedad autoinmune como Artritis Reumatoidea, usted no puede participar en el estudio. En ese caso nosotros le aconsejaremos sobre dónde y qué tan pronto debe buscar asistencia médica.

Procedimientos del estudio

Una vez verifiquemos que Usted es elegible para el estudio, nosotros le haremos algunas preguntas sobre la evolución de su enfermedad, como por ejemplo días de fiebre, síntomas y uso de medicamentos. Luego se le realizará un examen físico completo, que incluye una prueba de torniquete (similar a la toma de la presión arterial). Hoy se le tomará una muestra de sangre en una vena de su antebrazo (16ml 3 cucharadas en mayores de 10 años, 12ml en niños entre los 9 y 2 años y 6ml en menores de un año). La muestra de sangre será usada para realizar un cuadro hemático, pruebas de la coagulación, medir enzimas del hígado, del músculo, entre otras y hacer el diagnóstico de la causa de su fiebre. Posteriormente, usted será valorado diariamente en la institución de salud, en su casa o donde nos lo indique, al menos hasta el sexto día después del inicio de la fiebre o hasta que su condición clínica lo requiera. En el caso que sea hospitalizado este procedimiento se realizará por el equipo de salud del estudio en el sitio donde se encuentre. Además, se realizará un último control 15 días después del inicio de la enfermedad y se tomará una última muestra de sangre (igual cantidad a la que le tomaremos hoy), que será utilizada para confirmar la infección por dengue. En total el tiempo de participación en el estudio en promedio es de 2 semanas.

Código

Confidencialidad

Toda la información obtenida será manejada por los investigadores protegiendo su privacidad; a usted se le asignará un código y su nombre será borrado de las bases de datos, sólo los investigadores tendrán acceso al archivo en el cual se vincula su nombre con su código. Los datos del estudio se presentarán en forma de promedios y porcentajes y usted no será identificado de forma individual en ningún caso.

Riesgos y beneficios

Los riesgos de este estudio incluyen que al tomar la muestra de sangre se produzca un dolor transitorio, con una probabilidad mínima de infección y algunas personas pueden desarrollar un "morado" o hematoma pequeño (pequeña cantidad de sangre debajo de la piel), que desaparece en una semana. La toma de sangre se realizará por personal capacitado y con equipo nuevo, estéril y no reutilizable, para evitar el riesgo de infección. Usted se beneficiará directamente de la participación al tener los resultados de los exámenes de sangre que se le van a realizar y el seguimiento médico. Además, esperamos que su participación beneficie a otras personas con dengue y a futuro poder conocer que complicaciones por dengue se están presentando en nuestro país y que características se asocian a estas complicaciones.

En el caso en que se con nueva información sobre el dengue con la cuál usted se pueda beneficiar esta le será informada.

Costo y compensación

Su participación en este estudio no le generará ningún gasto. Todas las valoraciones médicas realizadas y las pruebas sanguíneas serán gratuitas, al igual que las visitas domiciliarias hechas por el personal de salud del estudio. Usted no recibirá pago alguno por su participación en el estudio.

Nosotros le daremos los resultados de su cuadro hemático pero no los datos de las pruebas enzimáticas porque no es claro que significado tienen valores altos o bajos de estos marcadores en la infección que usted tiene.

Derecho a Rehусar o Abandonar el estudio

Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria. En caso de no aceptar participar en él, la conducta de su médico y del equipo de salud no se modificará y se le brindará la misma atención ofrecida a otros pacientes que tienen su misma condición. Aún después de aceptar participar usted tendrá el derecho de retirarse del estudio o de negarse a contestar una pregunta o de proveer una muestra de sangre en el momento que usted lo desee.

Preguntas

Por favor, siéntase en la libertad de hacerme cualquier pregunta si hay algo que no haya quedado claro. Además, si Usted tiene alguna pregunta adicional acerca del estudio más adelante, Usted puede contactar al Dr. Luis Angel Villar Centeno (Investigador principal) al teléfono 3003949888, a la médica Ruth Aralí Martínez o a la enfermera Janeth Florez al teléfono (7) 6345781 de Bucaramanga, o al teléfono 6344000 ext. 3204 – 3205 o la dirección carrera 32 # 29-31 oficina 304, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Facultad de Salud UIS. Si Usted tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como participante en este estudio, Usted puede contactar al Comité de Ética en la Facultad de Salud de la UIS a los teléfonos 6456325 o 6343125.

Declaración del participante

Código

Nosotros le entregaremos una copia de este documento. Al firmar este, Usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado y que está de acuerdo en participar como un sujeto de investigación en este estudio.

Usted está de acuerdo en:

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|---|
| ☐ Si | ☐ No | Contestar a las preguntas de una entrevista verbal |
| ☐ Si | ☐ No | Dejar que le tomen la presión arterial, peso, talla y le realicen un examen físico |
| ☐ Si | ☐ No | Dar muestra de sangre, para realizar cuadro hemático, pruebas de diagnóstico para dengue, otras pruebas relacionadas con el estudio. |
| ☐ Si | ☐ No | Permitir la realización de un último control médico después de los 15 días del inicio de la fiebre |
| ☐ Si | ☐ No | En caso de ser necesario permitir la realización de una ecografía, una radiografía de tórax, un electrocardiograma, o una tomografía del cerebro, o pruebas oftalmológicas. |
| ☐ Si | ☐ No | Permitir que en su muestra de sangre se midan proteínas del hígado, del páncreas, del músculo y otras sustancias inflamatorias. |
| ☐ Si | ☐ No | Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en estudios de factores bioquímicos asociados a la severidad de la enfermedad. |
| ☐ Si | ☐ No | Permitir que su muestra de sangre sea almacenada y usada en otros estudios futuros, incluyendo pruebas genéticas. |
| ☐ Si | ☐ No | En caso de fallecimiento durante la enfermedad febril permitir la realización de un autopsia científica con el fin de esclarecer la causa de la muerte |

¿Acepta Usted participar en este estudio voluntariamente? Si ☐ No ☐

Si Usted ha aceptado participar, por favor escriba su nombre y firma. Si el paciente es un menor de edad (< de 18 años) deberá además firmar uno de los padres.

Nombre del participante:	_____	
Cédula:	_____	
Fecha		
		Firma del participante
Nombre del padre o madre:	_____	
Cédula de ciudadanía:	_____	Firma

Código

Nombre del Testigo: _____ Relación: _____
Cédula: _____
Dirección: _____ Firma: _____

Nombre del Testigo: _____ Relación: _____
Cédula: _____
Dirección: _____ Firma: _____

Declaración del investigador

Yo certifico que le he explicado a esta persona esta investigación, y que esta persona entiende la naturaleza y propósito del estudio y los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho le han sido contestadas en forma adecuada.

Nombre del investigador: _____ Firma: _____

Versión 2. Aprobada por Comité de Ética de la UIS. Agosto 24 de 2009.

ANEXO 5: Aprobación Comité de Ética – Proyecto Filodinámica del virus Dengue serotipo 3 en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander durante el periodo 2001 a 2010"



4110

Bucaramanga,

Estudiante

LUZ AIDA REY CARO

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Facultad de Salud

UIS Presente

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto, "Filodinámica del virus Dengue serotipo 3 en el área metropolitana de Bucaramanga, Santander durante el periodo 2001 a 2010".

Cordial Saludo. El Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada el 08 y 12 de mayo de 2015, según consta en el acta No. 11, evaluó el proyecto del asunto, y al respecto se conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos del CEINCI-UIS, el Comité acuerda por consenso **AVALAR** el documento última versión y **APROBAR** el consentimiento informado.

Se recomienda aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.html>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

De igual manera emplear las estrategias que considere necesarias para verificar que el consentimiento informado ha sido comprendido por los participantes.

De otra parte, adoptar los mecanismos necesarios para garantizar la confidencialidad de la información recabada. Todo ello amparado en lo reglamentado en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 del Congreso de la República de Colombia, por la cual se dictan disposiciones para la protección de datos personales y en la Resolución de Rectoría 1227 del 22 de agosto de 2013, sobre el tratamiento de datos personales.

Se solicita que se remita al correo del Comité, información de las siguientes circunstancias, cuando lleguen a ocurrir:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.

Elaboró Dora I. Parra, revisó y aprobó Wellman Ribón.