

TRABAJOS ORIGINALES

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS SEROTIPOS DEL DENGUE EN EL PERÚ - AÑO 2001

Rosa Mostorino E¹, Angel Rosas A², Victoria Gutierrez P¹, Elizabeth Anaya R¹, Miguel Cobos Z¹, María García M¹.

¹ Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Proyecto Vigía (MINS/USAID). Ministerio de Salud. Lima, Perú.

RESUMEN

Objetivos: Determinar la distribución geográfica de los serotipos del virus dengue en el Perú en el año 2001 e identificar las manifestaciones clínicas asociadas a dichos serotipos a partir de las muestras que ingresaron al Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima, Perú. **Materiales y métodos:** En este estudio transversal analítico se incluyó 236 pacientes cuyas muestras sanguíneas resultaron confirmatorias de dengue por el método del aislamiento viral, realizado en el laboratorio de arbovirus y rickettsias durante el año 2001. Los datos clínicos de estos pacientes fueron extraídos de las fichas epidemiológicas enviadas por los establecimientos de salud en el ámbito nacional notificantes al INS. **Resultados:** Los cuatro serotipos del dengue estuvieron circulando en el Perú en el año 2001 (DEN-3 y DEN-4 recientemente identificados). La mayoría de los pacientes (76,7%) refirieron no haber tenido anteriormente dengue. Los pacientes con infección por el serotipo DEN-2 presentaron mayores síntomas y signos que aquellos infectados con DEN-1 y DEN-3; siendo este último serotipo el que produjo menor sintomatología en los pacientes. **Conclusiones:** Los cuatro serotipos del dengue están circulando en el país. El serotipo DEN-2 sería responsable de cuadros clínicos con mayor sintomatología o severidad.

Palabras clave: Dengue; Serotipos; Síntomas; Signos; Distribución; Infección primaria; Perú (fuente: BIREME).

SUMMARY

Objectives: To determine the geographic distribution of the serotypes of dengue virus in Peru in 2001 and to identify the clinical features associated to these serotypes from samples assessed at the National Institute of Health (NIH) in Lima, Perú. **Materials and Methods:** This analytical cross-sectional study included 236 patients with a confirmed diagnosis of dengue, obtained by viral isolation in the Arbovirus and Rickettsias Laboratory during 2001. The clinical data of these patients was obtained from the epidemiological formats sent by the health care services to the NIH. **Results:** The 4 dengue serotypes circulated in Peru during 2001 (DEN-3 and DEN-4 were recently identified). Most of the patients (76,7%) reported that they did not have previous dengue infections. The patients with infections by DEN-2 serotype had more symptoms and signs than the patients with DEN-1 and DEN-3. **Conclusions:** The 4 dengue serotypes are currently circulating in Peru. DEN-2 serotype would be responsible of more severe clinical presentations.

Key words: Dengue; Serotypes; Symptoms; Signs; Distribution; Primary infection (source: BIREME)

INTRODUCCIÓN

El Dengue en la actualidad es una de las arbovirosis humana de mayor importancia en salud pública, resultando endémico en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo¹⁻³. Anualmente, en el mundo, se reportan aproximadamente 50-100 millones de casos de dengue clásico (DC) y 250 000 a 500 000 casos de dengue hemorrágico (DH)⁴, constituyéndose esta enfermedad en la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños del sudeste de Asia⁵.

Dos quintas partes de la población mundial viven en áreas de riesgo para dengue, mayormente distribuidas en países en vías de desarrollo, donde la peligrosa combinación del abandono de condiciones ambientales, los

factores climatológicos y los índices crecientes de pobreza, dificultan la erradicación del *Aedes aegypti*, que actúa como vector⁶.

Antes de 1981, el dengue y su forma más grave (el DH) estaban consideradas como un problema del continente asiático que no amenazaba la región de las Américas. Este escenario cambió repentinamente como resultado, primero, de la epidemia cubana de 1981 y luego con la segunda epidemia en Venezuela, marcando claramente al dengue y al DH como enfermedad emergente en las Américas⁷.

En el Perú, los primeros casos de dengue en forma epidémica fueron reportados en la amazonía (Iquitos, Pucallpa y Tarapoto) en 1990 (7 858 casos en total), aislándose el serotipo DEN-1⁸. Desde entonces, el dengue se ha extendido en el país desde el oriente hacia el occidente y de norte a sur. En 1991, se notificaron

Correspondencia: Rosa Mostorino Elguera. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud.

Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú.

Tel.: (51-1) 431-1663 Fax: (51-1) 471-0179.

E-mail: rmostori@ins.gob.pe

epidemias en Tingo María y Chanchamayo; en 1992, en Tumbes; y en 1993; en Piura. En 1995 se presentó el primer reporte de dengue 2 en nuestro país durante un brote ocurrido en Iquitos y Pucallpa y en 3 ciudades de la costa norte (Tumbes, Máncora y Los Órganos)⁹. Los resultados del análisis filogenético de la secuencia del DNA de este virus DEN-2, mostraron que las cepas tenían genotipos americanos nativos, diferente de las cepas del sudeste asiático¹⁰.

En el año 2000, los casos de dengue clásico (DC) ascendieron a 5 550¹¹ y el año 2001 se registró el mayor número de casos de DC en el Perú (23 304 casos), reportándose importantes brotes epidémicos en los departamentos de la costa norte (Piura, La Libertad, Tumbes, Cajamarca y Lambayeque). Asimismo, en el año 2001, se registraron los primeros casos de DH, notificándose 250 casos y 3 defunciones (Piura y Tumbes con 99,2% de casos)¹².

Durante el año 2001, el Instituto Nacional de Salud (INS) recibió un total de 6 072 muestras procedentes de 16 departamentos del Perú, determinándose 1 593 casos positivos a dengue por serología (ELISA captura IgM), que representa 6,8% de los casos reportados como probables en el mismo año. De éstos, en 236 muestras se realizó el aislamiento viral en cultivo celular^{13,14}, lográndose identificar la circulación de los cuatro serotipos del dengue en la costa norte del país: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Se identificó además, por métodos de secuenciamiento genómico, la presencia de la variedad asiática del serotipo DEN-2 en muestras procedentes de la macroregión norte y de casos importados de Lima¹¹.

Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de esta arbovirosis en nuestro país, se diseñó el presente estudio que tuvo por objetivos determinar la distribución geográfica de los serotipos del virus dengue en el Perú en el año 2001 e identificar las manifestaciones clínicas asociadas a dichos serotipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Del 1 de enero al 31 de diciembre de 2001, el Laboratorio de Referencia Nacional de Arbovirus y Rickettsias del Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú, como parte de los procedimientos para la vigilancia epidemiológica del dengue, recibió un total de 6 072 muestras procedentes de pacientes con diagnóstico probable de dengue de 16 departamentos del Perú, se efectuó el diagnóstico serológico por la técnica ELISA de captura IgM en 1 593 (26,2%) pacientes. El método de aislamiento viral en cultivo celular y su tipificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue realizado en 236 (14,8%) pacientes. Para el presente estudio transversal analítico se incluyó a estos 236 pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral.

RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

El diagnóstico probable de dengue clásico (DC) o dengue hemorrágico (DH) fue realizado en los diversos establecimientos de salud del Perú, según los criterios de vigilancia epidemiológica de esta enfermedad². Según estos criterios, el caso probable de DC fue definido como aquel paciente con un cuadro febril agudo con dos o más de las siguientes manifestaciones: dolor de cabeza, dolor de ojos, dolor de articulaciones y dolores musculares. Y el caso probable de DH debió cumplir con los cuatro criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS): fiebre, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia (menor de 100 000/mm³) y extravasación del plasma por aumento de la permeabilidad capilar.

Los profesionales de salud de cada establecimiento, de acuerdo al sistema de vigilancia epidemiológica del dengue, se encargaron de registrar en una ficha epidemiológica: los datos generales de los pacientes que cumplieron con las definiciones de casos probables para dengue, sus antecedentes epidemiológicos, sus características clínicas y los tipos de muestras enviadas al laboratorio para su confirmación. Dichas fichas epidemiológicas no fueron idénticas en todos los establecimientos; sin embargo, la información clínica y epidemiológica que la mayoría de ellas contenían fueron muy similares.

TOMA DE MUESTRAS, TRANSPORTE Y EXÁMENES DE LABORATORIO

Previo consentimiento informado, se extrajo de cada paciente con diagnóstico probable de DC y DH, 5 a 10 mL de sangre por venopunción empleando tubos al vacío. Se separó el suero mediante centrifugación (2000 rpm por 10 minutos) o pasivamente (retracción del coágulo), dejándolo reposar a 4°C de 4 a 6 horas, para finalmente decantar el sobrenadante y extraer alícuotas en viales debidamente rotulados. Estos viales fueron enviados al laboratorio de referencia regional de la jurisdicción del establecimiento, de donde fueron enviados al Laboratorio de Referencia Nacional de Arbovirus y Rickettsias del INS para la confirmación del diagnóstico, manteniendo una cadena de frío adecuada. Dicha confirmación incluyó el aislamiento viral y la detección de anticuerpos antidengue.

El aislamiento viral fue realizado en todas las muestras de pacientes con diagnóstico probable de dengue que tenían un tiempo de enfermedad menor de 5 días, usando líneas celulares C636. En las muestras que presentaron efecto citopático (ECP), se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual mediante el uso de anticuerpos monoclonales detecta la presencia del virus y la serotipificación del antígeno viral. Para la detección de anticuerpos antidengue se usó la técnica de ELISA: GAC-ELISA (que detecta Ig G antidengue) y MAC-ELISA (Ig M antidengue).

Con exclusión de los pacientes con vacunación antiamarílica, basándose en los resultados del aislamiento viral y el GAC-ELISA, se definió para el análisis de *infección primaria*, como aquel paciente con aislamiento viral positivo y GAC-ELISA negativo, y como *infección anterior o secundaria* aquel paciente con aislamiento viral positivo y GAC-ELISA positivo.

ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE DENGUE POR AISLAMIENTO VIRAL

Los datos registrados en las fichas epidemiológicas de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral (236 en total) con sus respectivos resultados de la serotipificación del virus fueron ingresados a una base de datos previamente diseñada. Los resultados fueron expresados en frecuencias absolutas y relativas. Mediante análisis bivariado a través de pruebas no paramétricas (Chi-cuadrado, test de Fisher, Kruskal Wallis, según correspondía) se evaluó la existencia de asociación entre los serotipos aislados y las variables clínicas registradas en la ficha epidemiológica, considerándose un p menor de 0,05 como significativo. En el procesamiento y análisis de los datos se utilizó el pa-

quete estadístico SPSS 10,0 para Windows.

RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se describen los datos generales de los 236 pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral realizado en el INS durante el año 2001. El sexo femenino fue ligeramente más frecuente (52,1%). La edad media fue $31,06 \pm 16,4$ años, con predominio de los sujetos entre los 20 y 39 años. Sólo 17 (7,2%), del total de pacientes incluidos, refirieron haber recibido la vacuna antiamarílica. 32 (13,6%) habían viajado fuera de su departamento en los últimos 10 días y 6 (2,6%) refirieron haber tenido dengue anteriormente.

Cajamarca fue el departamento (de 14 en total) que tuvo la mayor cantidad de casos confirmados por el aislamiento viral (29,7%), seguido por Ucayali (17,4%), Piura (13,1%), La Libertad (8,9%) y Lambayeque (8,1%). Lima (12 casos), Ancash (3 casos) e Ica (1 caso) también reportaron casos de dengue confirmados por aislamiento viral. Sin embargo, estos 3 últimos departamentos fueron finalmente catalogados como casos importados que migraron de áreas con problema de dengue. La Figura N°1 muestra la distribución geográfica de los serotipos del dengue.

Tabla N° 1. Distribución geográfica y datos generales de los pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue

| | | Frecuencia | Porcentaje (%) |
|------------------------------------|-------------|------------|----------------|
| Departamento que reportó los casos | Cajamarca | 70 | 29,7 |
| | Ucayali | 41 | 17,4 |
| | Piura | 31 | 13,1 |
| | La Libertad | 21 | 8,9 |
| | Lambayeque | 19 | 8,1 |
| | Lima* | 12 | 5,1 |
| | Tumbes | 11 | 4,7 |
| | Huánuco | 6 | 2,5 |
| | Loreto | 5 | 2,1 |
| | San Martín | 4 | 1,7 |
| | Amazonas | 3 | 1,3 |
| | Ancash* | 3 | 1,3 |
| | Junín | 3 | 1,3 |
| | Ica* | 1 | 0,4 |
| Ignorado | 6 | 2,5 | |
| Sexo | Femenino | 123 | 52,1 |
| | Masculino | 113 | 47,9 |
| Edad (años) | < 5 | 3 | 1,3 |
| | 5-14 | 29 | 12,3 |
| | 15-19 | 27 | 11,4 |
| | 20-29 | 65 | 27,5 |
| | 30-39 | 44 | 18,6 |
| | 40-49 | 28 | 11,9 |
| | 50-59 | 21 | 8,9 |
| | 60 ó > | 14 | 5,9 |
| Ignorado | 5 | 2,1 | |
| Vacuna antiamarílica | No | 162 | 68,6 |
| | Sí | 17 | 7,2 |
| | Ignorado | 57 | 24,2 |
| Viaje en los últimos 10 días | No | 174 | 73,7 |
| | Sí | 32 | 13,6 |
| | Ignorado | 30 | 12,7 |
| Dengue anteriormente | No | 204 | 86,4 |
| | Sí | 6 | 2,6 |
| | Ignorado | 26 | 11,0 |

* En estos departamentos los casos fueron reportados como importados.

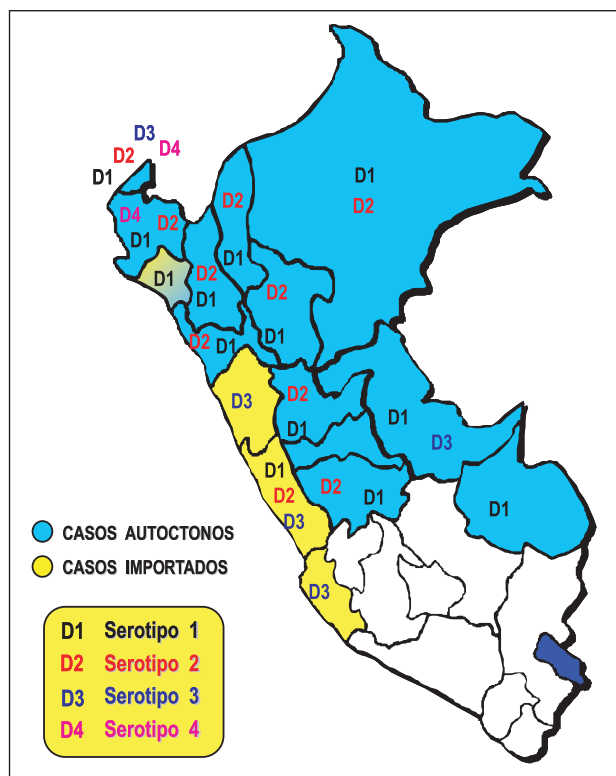


Figura N° 1. Distribución geográfica del virus dengue, Perú - 2001

De 236 pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral, 235 fueron reportados como casos probables de DC y sólo uno (0,4%) fue reportado como caso probable de DH, cumpliendo con los cuatro criterios establecidos por el sistema de vigilancia nacional. La Tabla N° 2 presenta las características clínicas del total de pacientes incluidos en el estudio. Los síntomas más frecuentes fueron cefalea (95,3%), dolor de cuerpo (72,0%), dolor retro-ocular (70,8%), escalofríos (67,4%), dolor articular (66,9%) y dolor de huesos (50,8%). Otros síntomas y signos encontrados fueron: náuseas (38,1%), dolor abdominal (33,1%), dolor de garganta (26,3%), tos (22,5%), congestión nasal (17,4%) y rash maculopapular (17,4%). Sólo se encontró algún tipo de manifestación hemorrágica en 19 (8,1%) pacientes y permeabilidad vascular alterada en 24 (10,2%) pacientes; 22 (9,3%) con petequias, 13 (5,5%)

con prueba de lazo positiva y 4 (1,7%) con equimosis. No hubo diferencias en el cuadro clínico entre varones y mujeres; sin embargo, se encontró diferencias según la edad en

Tabla N° 2. Manifestaciones clínicas de los pacientes con aislamiento viral positivo de dengue (en primera muestra)

| Manifestación clínica | Frecuencia | Porcentaje (%) |
|--|------------|----------------|
| Fiebre | 236 | 100,0 |
| Cefalea | 225 | 95,3 |
| Dolor de cuerpo | 170 | 72,0 |
| Dolor retro-ocular | 167 | 70,8 |
| Escalofríos | 159 | 67,4 |
| Dolor articular | 158 | 66,9 |
| Dolor de huesos | 120 | 50,8 |
| Náuseas | 90 | 38,1 |
| Dolor abdominal | 78 | 33,1 |
| Dolor de garganta | 62 | 26,3 |
| Tos | 53 | 22,5 |
| Congestión nasal | 41 | 17,4 |
| Rash | 41 | 17,4 |
| Inapetencia | 35 | 14,8 |
| Diarrea | 31 | 13,1 |
| Permeabilidad vascular alterada en general | 24 | 10,2 |
| Petequias | 22 | 9,3 |
| Algún sangrado | 19 | 8,1 |
| Dolor de espalda | 15 | 6,4 |
| Prueba de Lazo (+) | 13 | 5,5 |
| Mialgias | 12 | 5,1 |
| Ictericia | 5 | 2,1 |
| Equimosis | 4 | 1,7 |

algunos síntomas y signos. Así, los sujetos mayores o igual a 15 años tuvieron mayor probabilidad de tener dolor de huesos ($p = 0,037$), escalofríos ($p = 0,019$) y rash ($p = 0,022$) que aquellos menores de 15 años.

La Tabla N° 3 presenta los resultados de otras pruebas diagnósticas realizadas en las muestras séricas con aislamiento viral positivo. Se encontró presencia de anticuerpos IgG (mediante el GAC-ELISA) en 22 muestras (9,3%) y presencia de IgM (mediante el MAC-ELISA) en 7 muestras (3,0%). Los serotipos identificados mediante la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en los aislamientos virales en cultivos celulares fueron: DEN-1 en 130 (55,1%) muestras, DEN-2 en 48 (20,3%), DEN-3 en 56 (23,7%) y DEN-4 en 2 (0,8%).

Tabla N° 3. Resultados del GAC-ELISA, MAC-ELISA y serotipificación del virus Dengue (en primera muestra)

| | | Frecuencia | Porcentaje (%) |
|------------------------------|----------------|------------|----------------|
| IgG ELISA | Positivo | 22 | 9,3 |
| | Negativo | 184 | 78,0 |
| | No se realizó | 30 | 12,7 |
| IgM ELISA | Positivo | 7 | 3,0 |
| | Negativo | 2 | 0,8 |
| | No concluyente | 80 | 33,9 |
| | No se realizó | 147 | 62,3 |
| Aislamiento viral (serotipo) | DEN-1 | 130 | 55,1 |
| | DEN-2 | 48 | 20,3 |
| | DEN-3 | 56 | 23,7 |
| | DEN-4 | 2 | 0,8 |
| Total | | 236 | 100,0 |

Con la finalidad de lograr una aproximación al porcentaje de infecciones primarias de dengue, se excluyeron del análisis los 17 pacientes que refirieron haber recibido la vacuna anti amarilica, ya que dicha vacuna produce reacción cruzada inmunológica humoral contra los flavivirus, y reacción cruzada con pruebas serológicas para el diagnóstico del dengue como el GAC-ELISA. En la Tabla N° 4 se muestran los resultados de esta prueba GAC-ELISA según serotipo viral aislado. La mayoría de pacientes (76,7%) no tuvo presencia de anticuerpos Ig G contra el dengue, señalando a la infección recientemente diagnosticada por el aislamiento viral como primaria, quedando pendiente la prueba de neutralización por reducción en placas (PRNT) que determina la clasificación de las infecciones por dengue. Según serotipo, el estimado de infecciones primarias fue: 83,6% (102/122) para DEN-1, 88,6% (39/44) para DEN-2, 50,0% (26/52) para DEN-3 y 100,0% (1/1) para DEN-4.

La Tabla N° 5 describe las manifestaciones clínicas de los pacientes con aislamiento viral positivo según resultado del GAC-ELISA, excluyendo también a los pacientes que refirieron vacunación anti amarilica. La mayoría de síntomas y signos reportados en los pacientes IgG

negativos (infección primaria) y en aquellos IgG positivos (infección anterior) no difirieron; sin embargo, los pacientes con infección anterior por el virus dengue tuvieron mayor proporción de mialgias ($p = 0,042$) y dolor de espalda ($p = 0,046$).

Las manifestaciones clínicas de los pacientes según el serotipo identificado son presentadas en la Tabla N° 6. Excluyendo del análisis a los pacientes con serotipo DEN-4 por su escaso número, se encontraron algunas diferencias en el cuadro clínico presentado según el serotipo identificado. La proporción de pacientes con dolor de cuerpo ($p < 0,001$), dolor retro-ocular ($p < 0,001$), escalofríos ($p = 0,001$) y dolor de garganta ($p = 0,001$) fue mayor en los pacientes con DEN-1 y DEN-2 que en aquellos con DEN-3. La proporción de pacientes con rash dérmico fue mayor en aquellos con DEN-1 que en aquellos con DEN-2 y DEN-3 ($p = 0,027$). La proporción de pacientes con dolor de huesos ($p < 0,001$), congestión nasal ($p = 0,04$), inapetencia ($p = 0,008$) y prueba de lazo positiva ($p = 0,021$) fue mayor en los sujetos con DEN-2 que en aquellos con DEN-1 y DEN-3.

Tabla N° 4. Resultados del GAC-ELISA según serotipo del virus aislado (con exclusión de los pacientes que recibieron la vacuna anti amarilica)

| | | IgG Elisa | | | | | |
|-----------------|-------|-----------|------|----------|-------|---------------|------|
| | | Positivo | | Negativo | | No se realizó | |
| | | n | % | n | % | n | % |
| SEROTIPO DENGUE | DEN-1 | 12 | 9,8 | 102 | 83,6 | 8 | 6,6 |
| | DEN-2 | 5 | 11,4 | 39 | 88,6 | 0 | 0,0 |
| | DEN-3 | 4 | 7,7 | 26 | 50,0 | 22 | 42,3 |
| | DEN-4 | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Total | | 21 | 9,6 | 168 | 76,7 | 30 | 13,7 |

Tabla N° 5. Manifestaciones clínicas de los pacientes aislamiento viral positivo según resultado del GAC-ELISA

| | Ig G negativo (n=168) | | Ig G positivo (n=21) | | p |
|---------------------------------|--------------------------|------|-------------------------|------|-------|
| | n | % | n | % | |
| Cefalea | 159 | 94,6 | 20 | 95,2 | NS |
| Dolor de cuerpo | 134 | 79,8 | 14 | 66,7 | NS |
| Dolor retroocular | 130 | 77,4 | 15 | 71,4 | NS |
| Escalofríos | 112 | 66,7 | 11 | 52,4 | NS |
| Dolor articular | 107 | 63,7 | 12 | 57,1 | NS |
| Dolor de huesos | 97 | 57,7 | 7 | 33,3 | NS |
| Nauseas | 67 | 39,9 | 8 | 38,1 | NS |
| Dolor abdominal | 56 | 33,3 | 6 | 28,6 | NS |
| Dolor de garganta | 52 | 31,0 | 6 | 28,6 | NS |
| Tos | 40 | 23,8 | 5 | 23,8 | NS |
| Congestión nasal | 30 | 17,9 | 5 | 23,8 | NS |
| Rash | 31 | 18,5 | 2 | 9,5 | NS |
| Inapetencia | 29 | 17,3 | 4 | 19,0 | NS |
| Diarrea | 23 | 13,7 | 2 | 9,5 | NS |
| Permeabilidad vascular alterada | 19 | 11,3 | 3 | 14,3 | NS |
| Petequias | 17 | 10,1 | 3 | 14,3 | NS |
| Algún sangrado | 14 | 8,3 | 3 | 14,3 | NS |
| Dolor de espalda | 9 | 5,4 | 4 | 19,0 | 0,042 |
| Prueba de Lazo (+) | 13 | 7,7 | 0 | 0,0 | NS |
| Mialgias | 5 | 3,0 | 3 | 14,3 | 0,046 |
| Ictericia | 4 | 2,4 | 1 | 4,8 | * |
| Equimosis | 4 | 2,4 | 0 | 0,0 | * |

* Tamaño muestral pequeño para establecer diferencias estadísticas.

El número de síntomas y signos presentado por los pacientes fue similar en los pacientes con presencia de anticuerpos IgG negativo (infección primaria) y aquellos con IgG positivo (infección anterior). Excluyendo los pacientes con serotipo DEN-4, se encontró diferencia

significativa en el número de síntomas o signos presentados según el serotipo identificado (Tabla N° 7): los pacientes con DEN-3 tuvieron menor frecuencia de síntomas que aquellos con DEN-1 y DEN-2 ($p < 0,001$).

Tabla N°6. Manifestaciones clínicas de los pacientes con aislamiento viral positivo según serotipo encontrado

| | DEN-1 (n=130) | | DEN-2 (n=48) | | DEN-3 (n=56) | | p [†] |
|--|------------------|------|-----------------|------|-----------------|------|----------------------|
| | n | % | n | % | n | % | |
| Cefalea | 126 | 96,9 | 45 | 93,8 | 52 | 92,9 | NS |
| Dolor de cuerpo | 113 | 86,9 | 39 | 81,3 | 17 | 30,4 | < 0,001 [‡] |
| Dolor retro-ocular | 112 | 86,2 | 36 | 75,0 | 18 | 32,1 | < 0,001 [‡] |
| Escalofríos | 99 | 76,2 | 32 | 66,7 | 27 | 48,2 | 0,001 [‡] |
| Dolor articular | 90 | 69,2 | 27 | 56,3 | 39 | 69,6 | NS |
| Dolor de huesos | 65 | 50,0 | 36 | 75,0 | 19 | 33,9 | < 0,001 [‡] |
| Nauseas | 50 | 38,5 | 22 | 45,8 | 18 | 32,1 | NS |
| Dolor abdominal | 41 | 31,5 | 15 | 31,3 | 21 | 37,5 | NS |
| Dolor de garganta | 45 | 34,6 | 11 | 22,9 | 5 | 8,9 | 0,001 [‡] |
| Tos | 33 | 25,4 | 12 | 25,0 | 8 | 14,3 | NS |
| Congestión nasal | 19 | 14,6 | 16 | 33,3 | 6 | 10,7 | 0,04 [‡] |
| Rash | 30 | 23,1 | 7 | 14,6 | 4 | 7,1 | 0,027 [‡] |
| Inapetencia | 21 | 16,2 | 12 | 25,0 | 2 | 3,6 | 0,008 [‡] |
| Diarrea | 15 | 11,5 | 6 | 12,5 | 9 | 16,1 | NS |
| Permeabilidad vascular alterada en general | 16 | 12,3 | 5 | 10,4 | 3 | 5,4 | NS |
| Petequias | 15 | 11,5 | 5 | 10,4 | 2 | 3,6 | NS |
| Algún sangrado | 13 | 10,0 | 5 | 10,4 | 1 | 1,8 | NS |
| Dolor de espalda | 12 | 9,2 | 3 | 6,3 | 0 | 0,0 | NS |
| Prueba de lazo (+) | 7 | 5,4 | 6 | 12,5 | 0 | 0,0 | 0,021 [‡] |
| Mialgias | 3 | 2,3 | 1 | 2,1 | 8 | 14,3 | * |
| Ictericia | 3 | 2,3 | 2 | 4,2 | 0 | 0,0 | * |
| Equimosis | 2 | 1,5 | 1 | 2,1 | 1 | 1,8 | * |

* Tamaño muestral demasiado pequeño para establecer diferencias estadísticas.

[†] p encontrado al comparar los síntomas excluyendo a dos pacientes con aislamiento del virus del dengue serotipo 4.

[‡] p significativo en la comparación del síntoma o signo entre los pacientes con aislamiento de los serotipos DEN-1, DEN-2 y DEN-3.

NS: No significativo.

Tabla N° 7. Número de síntomas y signos presentados por los pacientes según serotipo identificado en el aislamiento viral

| SEROTIPO DENGUE | | 1 a 4 síntomas o signos | | Más de 4 síntomas o signos | |
|-----------------|---------|----------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
| | | n | % | n | % |
| DEN-1 | DEN-1 | 18 | 13,8 | 112 | 86,2 |
| | DEN-2 | 8 | 16,7 | 40 | 83,3 |
| | DEN-3 * | 32 | 57,1 | 24 | 42,9 |
| Total | | 59 | 25,0 | 177 | 75,0 |

* $p > 0,001$ al comparar el número de síntomas o signos presentados según serotipo, excluyendo el grupo con aislamiento del serotipo 4.

DISCUSIÓN

Durante el año 2001, el Instituto Nacional de Salud (INS) confirmó el diagnóstico de dengue por aislamiento viral de 236 pacientes. Dichos pacientes fueron de todas las edades con predominio del grupo etáreo entre los 20 y 39 años, señalando la importancia de esta enfermedad en población joven adulta. El grupo menor de 14 años representó 13,6%, porcentaje menor al encontrado en otros países del Asia, en donde son los niños los más afectados por esta enfermedad⁵.

Sólo 7,2% de estos pacientes refirieron haber recibido la vacuna anti amarilica, porcentaje bajo al considerar que la mayoría de ellos provienen de zonas consideradas en riesgo para fiebre amarilla. Aunque, el número de casos reportados por fiebre amarilla en nuestro país ha

disminuido en los últimos años (2000 y 2001)^{16,17} después de las epidemias presentadas durante el periodo de 1985-1995 y en el año 1998, el riesgo de brotes por esta enfermedad altamente letal persiste sobre todo en zonas de selva alta con alta migración por fines laborales. Por tanto, su control requiere de estrategias multisectoriales, siendo una de éstas y quizás la más importante el incrementar la cobertura de vacunación.

Del total de 236 pacientes con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral, alrededor de 10,0% presentó algún tipo de hemorragia o alteración de la permeabilidad vascular; sin embargo, sólo uno (0,4%) fue reportado como caso probable de dengue hemorrágico. Este bajo porcentaje podría ser explicado por la rigurosidad

de los criterios recomendados por la OMS para el diagnóstico de caso probable de DH, que involucran exámenes de laboratorio adicionales (plaquetas, ecografía o radiografías) que no podrían ser realizados en muchos de los establecimientos reportantes. Por otro lado, debido a éste único caso de DH, en el artículo no se establece una diferenciación entre las formas clínicas del dengue.

La literatura reporta al dengue como una enfermedad de espectro clínico variable, pudiendo presentarse infecciones asintomáticas e inaparentes, cuadros clásicos leves y severos, y cuadros hemorrágicos ocasionalmente fatales, dependiendo del ambiente epidemiológico en el cual el virus específico circula en un vector adecuado y en una población susceptible¹⁸. Las manifestaciones clínicas del dengue presentadas por los pacientes confirmados virológicamente por el INS en el 2001, son similares a las encontradas en las descripciones clínicas de los brotes ocurridos en Cuba¹⁹, Puerto Rico²⁰, Brasil²¹ y en Iquitos – Perú (1990)⁸ y en la mayoría de revisiones de esta enfermedad^{1,22-24}; con cuadros caracterizados por una variedad de signos y síntomas inespecíficos con predominio de fiebre, cefalea, dolores osteo-mioarticulares y dolores retroculares. Sin embargo, el rash maculopapular descrito frecuentemente en las epidemias de dengue (sobre todo en niños)^{25,26} no alcanzó un alto porcentaje de presentación dentro de nuestros pacientes.

Las manifestaciones hemorrágicas predominantes de los pacientes confirmados como dengue a través del aislamiento viral fueron las petequias, aunque con un porcentaje de presentación bajo (9,3%). Otras manifestaciones hemorrágicas menos frecuentes fueron el sangrado de mucosas (8,2%) y la prueba de lazo positiva (5,5%). Estudios realizados durante las epidemias de dengue en Centroamérica (Nicaragua y Cuba) reportan a la prueba de lazo positiva como la manifestación hemorrágica más frecuente^{25,27-29}, mayor aún en niños²⁷.

Aunque la mayoría de síntomas y signos no mostraron diferencias en su presentación según grupos etáreos, se encontró que los sujetos con edades mayores o iguales a 15 años tuvieron mayor probabilidad de tener dolor de huesos, escalofríos y rash que aquellos menores de 15 años. Numerosos estudios han señalado que la mayoría de infecciones por dengue en niños cursa con cuadros clínicos asintomáticos o leves, caracterizados sólo por fiebre indiferenciada asociada o no al rash, mientras que son los adultos quienes tienden más a desarrollar cuadros más sintomáticos y típicos de dengue caracterizados por fiebre alta, cefalea intensa, mialgias, artralgias, dolores retro-oculares y rash maculopapular^{22,30-32}.

No encontramos diferencias entre ambos grupos etáreos respecto a manifestaciones hemorrágicas como la prueba de lazo, petequias, equimosis o presencia de algún sangrado. Estudios realizados en Tailandia y otros países del continente asiático han reportado un mayor riesgo de cuadros hemorrágicos de dengue en niños^{33,34}, sugiriendo que eso se debe quizás a una mayor permeabilidad vascular con respecto a los adultos³⁵. En América, sin embargo, la distribución por edad del DH es diferente, observándose en brotes de Cuba, Venezuela, Brasil y Puerto Rico, donde la enfermedad ocurre en todas las edades, aunque con mayores casos fatales en los niños³⁶⁻³⁸.

La identificación de serotipos mediante la inmunofluorescencia en los aislamientos virales, confirmó la circulación de los cuatro serotipos del dengue en nuestro país en el año 2001 (Figura N°1). El DEN-1 fue el primer serotipo descrito en el Perú, siendo reportado por primera vez en un brote de dengue en Iquitos en 1990⁸. Posteriormente, el INS lo ha encontrado circulando en Madre de Dios (Tambopata 1992), Huánuco, Junín, San Martín y Tumbes (1994), Piura (1997), Loreto (1998), Ucayali (1999) y La Libertad (2000)³⁹. En el año 2001, el DEN-1 fue probablemente el causante de la mayoría de infecciones por el virus dengue en el Perú, siendo encontrado en 11 departamentos: 9 de los cuales ya habían reportado casos en años anteriores y 2 (Lambayeque y Amazonas) serían los dos nuevos departamentos afectados por este serotipo en el 2001.

DEN-2 fue reportado por primera vez en un brote ocurrido en Iquitos, Pucallpa y en 3 ciudades de la costa norte (Tumbes, Máncora y Los Órganos) en 1995 por Watts y col⁹. Luego, el INS lo identificó por primera vez en Amazonas, Cajamarca, San Martín y Huánuco (en 1996) y en Junín (en el 2000)⁴¹. En el año 2001, se ha encontrado al DEN-2 circulando en 8 departamentos, 2 de los cuales tendrían el DEN-2 por primera vez (Lambayeque y La Libertad).

DEN-4 ha estado circulando en el continente americano conjuntamente con DEN-1 y DEN-2 durante más de una década⁴⁰, en cambio, DEN-3 ha sido reportado como una reintroducción en Centroamérica hace 8 años, expandiéndose al Caribe y Sudamérica produciendo epidemias de DC y DH⁴¹. En el Perú no existen reportes anteriores documentados de la circulación de los serotipos DEN-3 y DEN-4, por lo que es posible que el 2001 sea el año de la introducción de estos nuevos serotipos a nuestro país. DEN-3 estaría circulando por los departamentos de Ucayali (mayor cantidad de pacientes), Piura, Tumbes y Cajamarca; y DEN-4 por los departamentos de Loreto y Piura. Es importante precisar que esta distribución geográfica está basada en los resultados del aislamiento viral de las muestras que llegaron al Instituto Nacional de Salud para la confirmación de la enfermedad.

Varias hipótesis han tratado de explicar la patogenia de la severidad del dengue y dengue hemorrágico. Rosen, planteó que los casos más severos y aquellos que llegaban al síndrome de shock por dengue eran debidos a la existencia de cepas muy virulentas, no tomando en cuenta los aspectos inmunológicos de la infección⁴². Hammon, sugirió en 1973, la probabilidad de que exista más de un virus asociado con el dengue, que agrava el cuadro de la enfermedad⁴³. En Cuba, en las epidemias de los años 1981 y 1997 se halló al virus de influenza, sin embargo, este virus por sí solo no aclaró la agravación del proceso. Halstead en 1970^{44,45}, planteó la teoría más aceptada sobre la patogénesis del dengue en la actualidad. Su teoría secuencial sostiene que las personas que ya fueron afectadas por un serotipo de dengue y tienen anticuerpos contra él (Inmunidad de por vida), al sufrir una nueva infección por otro serotipo viral llevaría a la formación de inmunocomplejos con el virus infectante desencadenando una enfermedad de mayor severidad. Las personas que viven en áreas endémicas de dengue podrían ser infectadas con tres o cuatro serotipos del dengue durante toda su

vida. Según esta teoría, las infecciones secundarias serían el principal factor de riesgo para la severidad de la enfermedad y el desarrollo de DH⁴⁶⁻⁴⁸.

En una parte de nuestro análisis se excluyó a los pacientes que recibieron la vacuna antiamarilla con la finalidad de lograr una estimación del porcentaje de infecciones primarias o anteriores de dengue ya que dicha vacuna produce reacción inmunológica humoral contra flavivirus, y reacción cruzada con pruebas serológicas para el diagnóstico del dengue. La detección de anticuerpos IgG antidengue a través de la prueba GAC-ELISA, identificó que 9,6% (21/219) pacientes probablemente habían tenido dengue anteriormente (infección anterior). Este porcentaje podría ser considerado bajo; sin embargo, la existencia de los cuatro serotipos en el país, el conocimiento de su extensión a nuevos departamentos y la dispersión y expansión geográfica del vector (*Aedes aegypti*) señalarían el grave riesgo de aparición de nuevas infecciones tanto primarias como secundarias, terciarias o cuaternarias.

El análisis de las manifestaciones clínicas (no hemorrágicas y hemorrágicas) de las infecciones primarias y secundarias no mostró mayor diferencia, a excepción de dos síntomas: dolor de espalda y mialgias, los cuales fueron encontrados en mayor proporción en aquellos con infecciones secundarias. Aunque el número de pacientes con aislamiento sólo representa una pequeña parte no al azar del total de los pacientes con dengue en el Perú, es posible que en nuestro medio, los cuadros clínicos de infecciones primarias y secundarias sean similares, no existiendo la predisposición a una mayor sintomatología, signología, severidad o manifestaciones hemorrágicas en un paciente que adquiere el dengue por segunda, tercera o cuarta vez. Por tanto, es posible que la teoría secuencial^{46,47} no explique exclusivamente los cuadros clínicos de dengue que se presentan en nuestro país, debiendo analizarse la enfermedad de una manera más integral, considerando otros factores relacionados al virus mismo y al huésped. Esta hipótesis integral de la patogénesis del dengue clásico y hemorrágico fue señalada por primera vez en 1987⁴⁹, tomando en cuenta las experiencias internacionales y cubanas en dengue hemorrágico, y señala que la intersección de tres grandes grupos de factores (virales, del huésped y epidemiológicos), determinarían la ocurrencia de casos severos y hemorrágicos de la enfermedad del dengue.

El análisis de las manifestaciones clínicas de los pacientes según el serotipo identificado mostró hallazgos importantes. La mayor cantidad de diferencias significativas del DEN-2 respecto a los otros serotipos y la mayor proporción de pacientes con lazo positivo (manifestación hemorrágica más frecuentemente encontrada en la mayoría de epidemias) con DEN-2, señalaría a este serotipo como el de mayor sintomatología y/o severidad en el Perú independientemente de la condición de infección primaria y secundaria.

Pocos estudios han evaluado diferencias entre los cuadros clínicos según los serotipos. El estudio realizado en Puerto Rico en 622 muestras séricas con confirmación virológica no encontró diferencias²²; sin embargo, otros estudios han señalado al DEN-2 como el serotipo causante de cuadros más sintomáticos, severos y con mayor predisposición a

manifestaciones hemorrágicas^{50,51}. Además, debe tomarse en consideración que la biología molecular ha identificado dos genotipos principales en este serotipo: el genotipo asiático del DEN-2 que ha sido relacionado con la mayoría de epidemias de DH en el sudeste de Asia y en América (Cuba, en 1981)⁵², y el genotipo americano, de menor virulencia, que no ha llegado a producir casos de fiebre hemorrágica en infecciones secundarias⁵³. El DEN-2 genotipo americano está presente en el Perú desde 1995¹⁰, y el genotipo asiático ha sido identificado a finales del año 2000, existiendo la posibilidad de un incremento de casos de DH en nuestro país, ante condiciones epidemiológicas propicias y huéspedes susceptibles.

Nuestros pacientes con dengue serotipo DEN-3, además de tener en general un menor número de manifestaciones clínicas que aquellos con DEN-1 y DEN-2, presentaron en menor proporción dolor de cuerpo, dolor retro-ocular, escalofríos y dolor de garganta; sugiriendo que en nuestro medio los pacientes infectados con el serotipo DEN-3 tendrían mayor probabilidad de presentar cuadros clínicos inaparentes, indiferenciados y de menor severidad que aquellos infectados por DEN-2 ó DEN-1. Este hallazgo no concuerda con las experiencias de los países asiáticos, en donde en años recientes DEN-3 ha incrementado su circulación asociándose a casos de DH en países que no habían tenido esta enfermedad previamente⁵⁴ o incrementado en aquellos que sí los habían tenido⁵⁵. Al igual que en DEN-2, en DEN-3 se han identificado genotipos específicos relacionados con una mayor severidad (mayor virulencia) de la enfermedad⁴³, siendo necesaria su identificación a fin de comprender la patogenia de la enfermedad producida por este serotipo en nuestro país.

Consideramos importante la información clínica presentada en nuestro estudio; sin embargo, se debe tomar en cuenta las limitaciones de ésta para una mejor interpretación de los resultados. La primera limitación estaría relacionada con la calidad de la información clínica, dado que se basó en la recolección de datos clínicos procedentes de las fichas epidemiológicas que los establecimientos enviaron al INS, no existiendo control estricto de su calidad. La segunda limitación, estaría dada por la imposibilidad de generalizar los resultados a todos los pacientes con diagnóstico de dengue, ya que nuestro trabajo se basó en el estudio de las características clínicas de un grupo específico de pacientes con dengue (aquellos con diagnóstico confirmatorio de dengue por aislamiento viral en el INS en el año 2001), siendo paso previo para éste el envío de las muestras de los pacientes con diagnóstico probable de dengue del establecimiento notificante al INS.

A través del presente trabajo damos a conocer la circulación de los cuatro serotipos en el país y su extensión a nuevos departamentos en el año 2001, lo cual aunado a la dispersión y expansión geográfica del vector (*Aedes aegypti*), la alteración de las variables climatológicas (fenómeno de El Niño), las inadecuadas condiciones de saneamiento ambiental de las zonas de riesgo y las características socio-culturales de la población, colocarían al país en una situación de gran vulnerabilidad para la aparición de epidemias de dengue y dengue hemorrágico en los próximos 2 años, siendo necesario establecer un efectivo plan de acción para la prevención y control de esta enfermedad en nuestro país.

REFERENCIAS

1. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11:480-96.
2. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Wallingford: CAB International; 1997.p. 1-22.
3. **Pinheiro FP, Corber SJ.** Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Americas. World Health Statist Quart 1997; 50: 161-8.
4. **World Health Organization.** Scientific working group on dengue. Meeting report, Geneva, Switzerland, 3-5 april 2000. Geneva: WHO; 2000.
5. **Guzmán MG, Kourí G, Bravo JR.** La emergencia de la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: reemergencia del dengue. Rev Cubana Med Trop 1999; 51(1): 5-13.
6. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una visión general del problema. Bol Epidemiol OMS 1992; 13(1): 9-10.
7. **OPS.** El dengue en Centroamérica: las epidemias del 2000. Bol Epidemiol OMS 2000; 21(2): 4-8.
8. **Phillips I, Need J, Escamilla J, Colán E, Sanchez S.** Primer brote de dengue documentado en la región amazónica del Perú. Bol Of Sanit Panam 1993; (6): 114.
9. **Watts D, Ramírez G, Cabezas C, Wooster MT.** Arthropod-Borne Diseases in Peru. Book chapter in *An Overview of Arthropod-Borne Diseases in Peru*. Evando Chagas Institute; 1998.
10. **Porter KR, Swing D, Puri B, Hayes CG, Halstead SB, Watts DM.** Genotype analysis of dengue 2 viral isolates from patients in the amazon river basin of Peru. Program and abstract of the 46 th Annual Tropical Medicine and Hygiene. 1997 (57).
11. **Oficina General de Epidemiología.** Dengue. Reporte epidemiológico semanal. 2001; 10(39): 1-12.
12. **Ministerio de Salud.** Análisis de la situación de salud del Perú. Lima: MINSA; 2002.
13. **Mostorino R, Montoya Y, Anaya E, Madani E, Gutiérrez V, Cobos M, et al.** Dengue: una enfermedad reemergente en el Perú. Bol – Inst Nac Salud 2001; 7(1-5): 7-8.
14. **Instituto Nacional de Salud.** Reporte de casos confirmados de enfermedades infecciosas – INS. Bol – Inst Nac Salud 2001; 7(6): 15-18.
15. **Ministerio de Salud / Oficina General de Epidemiología – Instituto Nacional de Salud.** Dengue clásico y dengue hemorrágico. Lima: MINSA/ OGE-INS; 2000. Módulo Técnico N° 7
16. **Organización Panamericana de la Salud.** Actualización sobre la fiebre amarilla en las Américas. Bol Epidemiol OPS 2000; 21(2): 13.
17. **Oficina General de Epidemiología.** Reporte epidemiológico semanal, SE 26. Lima: OGE; 2001.
18. **Deparis X, Murgue B, Roche C, Cassar O, Chungue E.** Changing clinical and biological manifestations of dengue during ten dengue-2 epidemic in French Polynesia in 1996/1997 – Description and analysis in prospective study. Trop Med Int Health 1998; 3: 859-65.
19. **Rodríguez O, Pérez A, Despaigne A, Irragarri C.** Caracterización de pacientes con diagnóstico presuntivo de dengue en el brote epidémico del año 1997. Rev Cubana Med Trop 2001; 53(1): 24-7.
20. **Cobra C, Rigau-Péres JG, Kuno G, Vorndman V.** Symptoms of dengue fever in relation to host immunologic response and virus serotype, Puerto Rico, 1990-1991. Am J Epidemiol 1995; 142(11): 1204-11.
21. **Figuereido LTM, Owa MA, Carlucci RH.** Estudio sobre diagnóstico laboratorial e síntomas do dengue, durante epidemia ocorrida na região de Riberão Preto, Sp, Brasil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 121-30.
22. **Hayes EB, Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. Pediatr Infect Dis J 1992; 11: 311-17.
23. **Waterman SH, Gubler DJ.** Dengue fever. Clin Dermatol 1989; 7: 117- 22.
24. **Martínez E.** Dengue y dengue hemorrágico. Aspectos clínicos. Salud Publ Mex 1995; 37(Suppl): 29-44.
25. **Vargas ME, Aguirre TM, Palacios H.** Características clínicas de la fiebre de dengue en niños durante el brote epidémico en Santiago de Cuba. Rev Cubana Med Trop 2001; 53(1): 20-3.
26. **González G, Méndez A.** Dengue en niños. Estudio de la epidemia en 1992 en Bucaramanga. Pediatría 1994; 29: 33-41.
27. **Martínez E.** Dengue y dengue hemorrágico. Quilmas: Universidad Nacional de Quilmas; 1998.
28. **Guzman MG, Kourí G, Martínez E, Bravo J, Riverón R.** Clinical serological study of cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). Bull Pan Am Health Organ 1987; 21: 270-8.
29. **Guzmán MG, Vásquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R.** Dengue in Nicaragua, 1994: reintroducción del serotipo 3 en las Américas. Rev Panam Salud Publ 1997; 1(3): 193-8.

30. **Ennis FA.** Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 1997; 176: 313-21.
31. **Richards A, Bagus R, Baso S, Follows G.** The first reported outbreak of dengue haemorrhagic fever in Iran Jaya, Indonesia. *Am Trop Med Hyg* 1997; 57: 49-57.
32. **Kuberski T, Rosen L, Reed D.** Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue type 1 infections with haemorrhagic manifestations in Fiji. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 775-83.
33. **Nimmannitya S.** Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1987; 20: 325-30.
34. **Sumarmo T, Wulur H, Jahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K.** Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull World Health Organ* 1983; 61: 693-701.
35. **Gamble J, Bethell D, Day NPJ.** Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock?. *Clini Science* 2000; 98: 211-6.
36. **Rigau-Pérez JG, The Puerto Rico Association of Epidemiologists.** Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. *Rev Panam Salud Publica* 1997; 1: 381-8.
37. **Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C.** Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989; 67: 375-80.
38. **Zagne SMO, Alves VGF, Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W.** Dengue hemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 677-9.
39. **Instituto Nacional de Salud.** Distribución geográfica del virus dengue, 1992-2000. Lima:INS; 2001.
40. **Zárate M, Río A, Gómez H.** El diagnóstico del dengue en México: actualidad y perspectivas. *Salud Publ Mex* 1995; 37(Suppl): 105-11.
41. **Figueroa R, Ramos C.** Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Arch Med Res* 2000; 31: 429-30.
42. **Rosen L.** The emperor's new clothes revisited, or reflection on the dengue hemorrhagic fever. *Am Trop Med Hyg* 1997; 26: 337-43.
43. **Hammon W.** Dengue hemorrhagic fever - do we know its cause? *Am Trop Med Hyg* 1973; 22(1): 82-91.
44. **Halstead SB.** Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI hypothesis and discussion. *Yale JB Med* 1970; 42: 350-60.
45. **Halstead SB.** Immune enhancement of dengue infection, research question. *Dengue hemorrhagic fever. Proceeding of the First ICMR Seminar, Kobe, Japan, Nov. 1980:*115-57.
46. **Guzmán MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Álvarez M, Vázquez S, et al.** Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 793-9.
47. **Morens DM.** Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 500-12.
48. **Guzmán MG, Kourí L, Bravo J, Soler M, Vázquez S, Morier L.** Dengue hemorrhagic in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiological study. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 179-84.
49. **Kourí GP, Guzmán MG, Bravo JR.** Why dengue haemorrhagic fever in Cuba?: an analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 821-3.
50. **Guzmán M, Kourí G.** Dengue: an update. *Lancet* 2002; 2(9): 33-43.
51. **Vaughn D, Green S, Kalayanaroj S, Innis B, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al.** Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181: 2-9.
52. **Guzmán MG, Deubel V, Pelegrino JL.** Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 241-6.
53. **Watts DM, Porter KR, Putvatana P.** Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999; 354: 1431-3.
54. **Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler D, Trent D.** Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 1994; 75: 65-75.
55. **Centre for Disease Control and Prevention.** Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama, October- November 1994. *MMWR* 1995; 44: 21-24.