

## **Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017\***

Laboratory surveillance of dengue fever and other arboviruses in Cuba, 1970-2017

María G. Guzmán<sup>1\*</sup>

Susana Vázquez<sup>1</sup>

Mayling Álvarez<sup>1</sup>

José L. Pelegrino<sup>1</sup>

Didye Ruiz Amores<sup>1</sup>

Pedro Ariel Martínez<sup>1</sup>

Maritza Pupo<sup>2</sup>

Luis Morier<sup>1</sup>

Luis Valdés<sup>3</sup>

Otto Peláez<sup>4</sup>

Irina Valdivia<sup>5</sup>

Alina Llop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Centro Colaborador OMS-OPS para el Estudio del Dengue y su Control. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad de La Habana. Facultad de Biología. Cuba.

<sup>3</sup>Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Santiago de Cuba. <sup>4</sup>Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana. Cuba.

<sup>5</sup>Centro de Inmunoensayo (CIE). La Habana, Cuba.

\*Autor de la correspondencia. Correo electrónico: lupe@ipk.sld.cu

## RESUMEN

Los arbovirus constituyen una de las principales causas de emergencia en salud por la morbilidad y mortalidad que producen y el estrés sanitario que conllevan. Cuba no ha estado exenta de riesgo, y el enfrentamiento del dengue inicialmente y de otros arbovirus después, ha sido, y es, una prioridad de las máximas autoridades del país. La vigilancia de laboratorio de dengue se estableció desde inicios de la década del 70 aunque sus objetivos y estrategias han cambiado según la situación epidemiológica nacional y regional y la tecnología de diagnóstico disponible. Se destacan cuatro etapas en su desarrollo. En este trabajo se resumen las estrategias desarrolladas para la vigilancia de laboratorio de dengue y de otros arbovirus en el periodo de 1970 a 2017. Se describe además el papel desempeñado por el Instituto de Medicina Tropical, "Pedro Kouri" (IPK) como Laboratorio Nacional de Referencia.

**Palabras clave:** dengue; arbovirus; Cuba.

## ABSTRACT

Arboviruses are one of the leading causes of health emergencies due to their morbidity and mortality and the sanitary stress they bring about. Cuba has not been free from risk, and the response first to dengue fever and then to other arboviruses has been and still is a priority for the country's top authorities. Laboratory surveillance of dengue fever was implemented in the 1970s, though its aims and strategies have evolved in keeping with the national and regional epidemiological situation, and the available diagnostic technology. Four stages stand out in the development of dengue laboratory surveillance. The present paper summarizes the strategies developed for laboratory surveillance of dengue fever and other arboviruses in the period 1970-2017. A description is also provided of the role played by Pedro Kourí Tropical Medicine Institute (IPK) as a national reference laboratory.

**Keywords:** dengue; arboviruses; Cuba.

Recibido: 18/05/2018.

Aceptado: 07/09/2018.

## INTRODUCCIÓN

Los arbovirus transmitidos por mosquitos y principalmente por mosquitos del género *Aedes* constituyen actualmente un reto a nivel mundial. La globalización, la urbanización no planificada ni controlada, el crecimiento poblacional, la inadecuada higiene ambiental, el incremento de las migraciones y viajes, el ineficiente control vectorial, la resistencia a los insecticidas, el cambio climático y diferentes factores sociales y económicos entre otros, han condicionado el incremento, en extensión y densidad del mosquito *Aedes aegypti*, y consecuentemente la expansión de los virus transmitidos por este vector.<sup>(1)</sup>

La emergencia y re-emergencia del dengue, la fiebre del Nilo Occidental y recientemente la emergencia de la fiebre chikungunya y la enfermedad por zika constituyen eventos epidemiológicos relevantes de los últimos 60 años.<sup>(2)</sup>

La región de Las Américas es hoy la zona geográfica con un mayor impacto de estas entidades, por lo que los países han fortalecido sus sistemas de salud para la prevención y control de las arbovirosis con el establecimiento de sistemas de vigilancia integrales (vigilancia clínico-epidemiológica y de laboratorio, vigilancia entomológica y ambiental).<sup>(3)</sup>

Cuba no ha estado exenta de riesgo,<sup>(4)</sup> y el enfrentamiento del dengue inicialmente y de otros arbovirus después, ha sido y es una prioridad de las máximas autoridades del país.

En este trabajo se resumen las estrategias desarrolladas en la vigilancia de laboratorio del dengue y de otros arbovirus entre 1970 a 2017 así como el papel desempeñado por el Instituto de Medicina Tropical, "Pedro Kouri" (IPK) como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR-IPK).

## SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL DENGUE Y DE OTROS ARBOVIRUS EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS Y EN CUBA

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) lideró una exitosa campaña de eliminación del mosquito *Aedes aegypti* en las Américas en los años 50 del siglo pasado. No obstante, paulatinamente, en las décadas del 60 y 70 algunos países se reinfestaron lo que condujo a: a) incremento en la frecuencia de brotes y epidemias de dengue, b) introducción y circulación de los cuatro serotipos de este agente (VDEN), c) circulación simultánea de dos o más serotipos en un mismo país, y d) reporte de dengue hemorrágico (DH). La tabla 1 muestra los principales hechos asociados a dengue y otros arbovirus en esta región.

**Tabla 1** - Principales hechos asociados a dengue y a otras arbovirosis en la región de las Américas\*

Año	Hecho	Observaciones
1953	Primer aislamiento de VDEN** en la región	Aislamiento de VDEN-2 en Trinidad Tobago
1963-1964	Epidemia de VDEN-2 y 3	
1968-1969	Epidemia de VDEN-2 y 3	
1977	Introducción en Jamaica del VDEN-1 y extensión posterior a Cuba, el Caribe, Sudamérica y Centroamérica	Pandemia de VDEN-1 en la región. Cuba reporta la epidemia de VDEN-1 que afectó a todo el país
1981	Primera epidemia de dengue hemorrágico (DH) en la región	Reportada en Cuba con 158 fallecidos, de ellos 101 niños
1981	Introducción del VDEN-4 en el Caribe	Detección en Dominica y extensión posterior a toda la región
1985	Introducción del mosquito <i>Aedes albopictus</i> en la región y extensión posterior	
1989	Segunda epidemia de DH Venezuela	Reporte posterior en otros países
1994	Reintroducción del VDEN-3 en la región	Reconocimiento casi al unísono en Nicaragua, Panamá y Costa Rica
1990-2010	Expansión del mosquito <i>Aedes aegypti</i> , co-circulación de varios serotipos del VDEN, hiperendemicidad de dengue, epidemias de DH	
2003	Introducción del virus del Nilo Occidental en la región	Extensión en Estados Unidos, Canadá y otros países de la región
2013	Año de mayor reporte de dengue en la región antes de la entrada de los VCHIK** y VZIK**	2 386 836 casos reportados en 2013 con 37 903 casos severos y 1 318 fallecidos
2013	Introducción del VCHIK en Saint Martin a finales de 2013	Entre 2014 y 2015, extensión rápida a otros países de la región
2015	Reconocimiento del VZIK en Brasil	Extensión rápida a otros países de la región en 2015 y 2016
2016-2017	Reporte en diciembre de fiebre amarilla selvática y periselvática en Brasil	

\*Desde la segunda mitad del siglo XX. \*\*VDEN (virus dengue); VCHIK (virus chikungunya); VZIK (virus zika).

El dengue fue considerado el arbovirus de mayor importancia en las Américas hasta finales de 2013. En diciembre de ese año se reporta la introducción del virus chikungunya (VCHIK) en la isla francesa de San Martín extendiéndose en pocos meses (reporte hasta el 29 de diciembre de 2014) por toda la región con 1 071 896 casos sospechosos, 22 796 confirmados, 169 fallecidos y 32 países con transmisión.<sup>(5)</sup> Brasil reportó la introducción del virus zika (VZIK) en mayo de 2015, virus que se extendió en pocos meses a más de 28 países en 2016 y a 48 hacia inicios de 2017 con 581 557 casos sospechosos, 221 874 casos confirmados y 3 689 casos confirmados de síndrome congénito asociado a la infección por VZIK.<sup>(6)</sup> A finales de diciembre de 2016, Brasil reporta transmisión de fiebre amarilla (FA) selvática y periselvática en las zonas de Bahía, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Sao Paulo y Tocantins, con un total de 792 casos confirmados, 519 en investigación y 274 fallecidos confirmados entre diciembre de 2016 a mayo de 2017.<sup>(7)</sup>

El dengue, la fiebre chikungunya y la enfermedad por zika constituyen actualmente las arbovirosis de mayor importancia en la región estando latente el peligro de urbanización de la FA.

Cuba mostraba altos niveles de infestación de *Aedes aegypti* y en 1977-78 reporta la primera epidemia de dengue de la segunda mitad del siglo XX causada por el VDEN-1. Esta se caracterizó como una epidemia de fiebre de dengue (FD), con más de 400 000 casos procedentes de todo el país.<sup>(8)</sup> Estudios sero-epidemiológicos mostraron que el 44,46 % de la población se infectó por este virus .

En 1981, Cuba reporta la primera epidemia de DH de la región, con más de 300 000 casos, 10 000 graves y muy graves y 158 fallecidos, de ellos 101 niños. La epidemia, causada por el VDEN-2 afectó a todas las provincias del país.<sup>(9)</sup> La transmisión se detuvo después de una intensa campaña de control del vector que duró 4 meses, y se logró su eliminación . El país estuvo libre de transmisión desde 1982 a 1996. En 1997, el municipio Santiago de Cuba reporta una epidemia de DH causada por el VDEN-2, con más de 5 000 casos, de ellos 205 de DH y 12 fallecidos (todos adultos).<sup>(10)</sup> En aproximadamente 6 meses se detuvo la transmisión.

En 2001-2002 se reporta una nueva epidemia de DH, causada por el VDEN-3, que afectó principalmente la Ciudad de La Habana.<sup>(11,12)</sup> Esta epidemia que comenzó en junio de 2001, fue precedida por un pequeño brote por VDEN-3 y 4 en cuatro áreas de salud de los municipios Boyeros, Playa y Lisa a finales del 2000.<sup>(13)</sup>

En 2005, se produjeron tres brotes pequeños de VDEN-3 y 4 en dos provincias del país (Ciudad de La Habana y Camaguey) los que fueron eliminados rápidamente y en 2006 se produce una epidemia por VDEN 3 y 4 que afectó a 12 provincias, con circulación en 5 de ellas de ambos serotipos y con casos de DH (todos en adultos). La epidemia fue controlada a principios de 2007. <sup>(14)</sup>

En el periodo de 2007 a 2017, se han registrado pequeños brotes de dengue en diferentes provincias que han sido controlados con circulación de varios serotipos virales.

Con excepción de un pequeño brote de fiebre chikungunya ocurrido en 2015 el cual fue eliminado rápidamente, no se ha reconocido la transmisión de este agente viral.

En el año 2016, precedido por el diagnóstico de casos importados de enfermedad por zika, se confirma la introducción y transmisión de este virus la cual se mantiene y se ha extendido a varias provincias. Aunque se ha reportado circulación de VDEN, se observa una disminución aparente de esta. La tabla 2 muestra un resumen de la historia reciente de los arbovirus en Cuba.

**Tabla 2** - Historia reciente del dengue y otras arbovirosis en Cuba\*

Año	Extensión	Número total de reportes	Número de casos de DH*	Número de fatales	Agente causal	Genotipo
1977	Todo el país	>500 000	0	0	VDEN-1	Genotipo americano-africano
1981	Todo el país	>300 000	>10 000 (adultos y niños)	158 (101 niños)	VDEN-2	Genotipo asiático
1997	Municipio Santiago de Cuba	5 000	205 (adultos)	12 (adultos)	VDEN-2	Genotipo americano/asiático
2000	Ciudad de La Habana	138	-	0	VDEN-3 y 4	Genotipos III y II, respectivamente
2001-02	Ciudad de La Habana	12 889	81 (adultos)	3 (adultos)	VDEN-3	Genotipo III
2001-02	Todo el país (excluyendo La Ciudad de La Habana)	1 614	3 (adultos)	0	VDEN-3	Genotipo III
2005	Ciudad de La Habana y Camaguey	Cifras no publicadas			VDEN-3 y 4	Genotipos III y II respectivamente
2006	País				VDEN1-4	Genotipos similares
2007-17	Brotos de dengue reportados y controlados en varias provincias					
2015	Pequeña transmisión autóctona de VCHIK totalmente eliminada				-	0
2016-17	Introducción de VZIK en varias provincias	-	0	VZIK	Linaje asiático	

\*DH (dengue hemorrágico); VDEN (virus dengue); VCHIK (virus chikungunya); VZIK (virus zika).

## DIAGNÓSTICO DE LOS ARBOVIRUS

El diagnóstico de los arbovirus puede efectuarse por métodos directos (detectan y confirman la infección viral) y métodos indirectos (brindan un diagnóstico presuntivo) (tabla 3).

**Tabla 3 - Diagnóstico virológico y serológico de las arbovirosis\***

Métodos directos	Día de colecta de la muestra en relación al inicio de los síntomas	Tipo de muestra	Interpretación de las pruebas resultados positivos
Aislamiento viral: inoculación de ratones lactantes o de cultivos de células de mosquito <i>Aedes albopictus</i> (C6/36 HT), <i>Aedes pseudoscutellaris</i> (AP-61) y cultivo de células de mamífero Vero y LLCMK2	0-4 días	Sangre, suero, orina, LCR, LA, tejidos	Infección confirmada
Detección de la proteína NS1 de VDEN (sistemas comerciales y tiras reactivas)	0-4 días	Sangre, suero, plasma	Infección confirmada de VDEN
PCR o PCR-TR	0-4 días	Sangre, suero, orina, LCR, LA, tejidos	Infección confirmada
Métodos indirectos			
Detección de anticuerpos IgM (sistemas comerciales y no comerciales en formato ELISA y tiras reactivas, TR)	≥ 6 días	Sangre, suero, plasma, sangre seca en papel de filtro	Monosero: sugestivo de infección reciente  Sueros pareados con seroconversión de anticuerpos, infección confirmada por un flavivirus o un alfavirus
Detección de anticuerpos IgG (formatos ELISA y TR)* Técnica de IH* Ensayo de Neutralización	Pares de sueros 1er suero: colectado entre 0-5 días o colectado para estudios de anticuerpos IgM 2do suero: colectado 14 a 21 días del 1er suero	Sangre, suero, plasma, sangre seca en papel de filtro	Seroconversión o incremento de 4 veces en el título de anticuerpos entre ambos sueros: infección confirmada por un flavivirus o un alfavirus

\*LCR (líquido cefaloraquídeo); LA (líquido amniótico); VDEN (virus dengue); PCR (técnica de reacción en cadena de la polimerasa); PCR-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; TR (tira rápida); IH (técnica de inhibición de la hemaglutinación).

Entre los métodos directos se destacan: a) el aislamiento del virus utilizando ratones lactantes inoculados por vía intracerebral así como cultivos de células de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36 HT y cultivos de células de mamífero como las células Vero (en dependencia del agente viral). La identificación viral se realiza mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando líquidos ascíticos hiperinmunes (LAH) o anticuerpos monoclonales específicos (AcM) al virus sospechado; b) la detección de antígenos virales o productos de la replicación viral como la proteína NS1 para el diagnóstico de dengue; y c) los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el PCR en tiempo real (PCR-TR) que permiten la detección del ácido nucleico viral.

En dependencia del virus, estos pueden detectarse en diferentes muestras clínicas como sangre, suero, orina, LCR, líquido amniótico, tejidos (hígado, bazo, cerebro, placenta, sangre de cordón umbilical) colectadas en la fase aguda de la enfermedad.

Entre los métodos indirectos, la serología permite la detección de anticuerpos (Acs) de tipo IgM (sugestivos de una infección reciente) y de tipo IgG. La técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) y las técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA o UltramicroELISA (UMELISA) han sido las más utilizadas en el diagnóstico serológico. El estudio de monoseros colectados al 5to-6to días de comienzo de la enfermedad permite la detección de Acs IgM. También permite la determinación de la presencia de títulos elevados de anticuerpos IgG. El estudio de sueros pareados utilizando ELISA de IgG como el método de ELISA de inhibición (MEI), permite detectar la seroconversión de anticuerpos o el incremento de cuatro veces o más del título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero, confirmando así la infección por flavivirus o alfavirus.<sup>(15,16,17)</sup> Los sueros pareados deben colectarse durante la fase aguda y convalescente de la enfermedad con un intervalo en la fecha de colecta de las muestras de 2 a 3 semanas.

El ensayo de neutralización constituye la técnica serológica de mayor especificidad y se utiliza para identificar el virus circulante en áreas geográficas donde circulan más de un arbovirus de la misma familia viral. No obstante muestra también algún grado de entrecruzamiento de los Acs dirigidos a virus de una misma familia ya sea un flavivirus o alfavirus .

La mayor utilidad de las técnicas disponibles hoy para el diagnóstico de los arbovirus se dirige principalmente al soporte de la vigilancia epidemiológica más que al manejo clínico del paciente.

## VIGILANCIA DE DENGUE EN CUBA

La vigilancia del dengue en Cuba se basa en cuatro pilares fundamentales: la clínica, la epidemiología, la entomología y la virología. Es un complejo sistema que se sustenta en la detección y el seguimiento de pacientes con un síndrome febril agudo de etiología no precisada para buscar, notificar y confirmar expeditamente los casos con sospecha clínica de esta enfermedad. Tiene como ganancia secundaria que en la meticulosidad que se pone en el seguimiento de los febriles identificados, se diagnostican precozmente otras enfermedades infecciosas o no de importancia médica. La presencia de un caso sospechoso de dengue, hace que se desencadenen acciones intensivas de vigilancia y control integrado, en las que interaccionan todos sus pilares, incluidas la pesquisa entomológica y la lucha antivectorial.<sup>(10, 11)</sup>

Los criterios de caso utilizados en la vigilancia de dengue en Cuba son: a) caso con sospecha clínica de dengue: paciente con fiebre y que al menos tenga asociado dos ó más de las siguientes manifestaciones: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, exantema, manifestaciones hemorrágicas y leucopenia;<sup>(3)</sup> b) caso probable: paciente con enfermedad febril aguda con dos o más de las siguientes manifestaciones: dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgias, artralgia, erupción, alguna manifestación hemorrágica y un resultado de UMELISA-Dengue IgM positivo;<sup>(18)</sup> y c) caso confirmado: los casos probables con un resultado positivo mediante ELISA de Captura de IgM en la primera muestra de suero y confirmado mediante el estudio del suero pareado por ELISA de IgG (MEI), o casos con aislamiento viral en el suero agudo o PCR o PCR-TR positivo.<sup>(19)</sup>

Los criterios de caso utilizados en la vigilancia de zika en Cuba son: a) caso sospechoso: paciente con exantema, generalmente maculopapular y pruriginoso y al menos dos o más de los siguientes signos o síntomas, fiebre o febrícula, conjuntivitis no purulenta, artralgias, mialgias, edema periarticular y b) caso confirmado: aquel caso sospechoso con una prueba de PCR-TR a VZIK positiva.

## **ETAPAS DE LA VIGILANCIA DE LABORATORIO DE DENGUE EN CUBA Y SU EXTENSIÓN A OTROS ARBOVIRUS**

La vigilancia de laboratorio de dengue se estableció en Cuba a inicios de la década del 70 y sus objetivos y estrategias han cambiado según la situación epidemiológica nacional y regional y la tecnología diagnóstica disponible.

En la estrategia de prevención y control que Cuba ha desarrollado en estas casi 5 décadas, la vigilancia de laboratorio ha desempeñado un papel fundamental permitiendo la detección de la transmisión o el incremento de esta, la caracterización de la situación epidemiológica, la caracterización del agente viral, el diagnóstico de casos graves y fallecidos, la confirmación de infección en la embarazada así como la certificación del cese de la transmisión.

En el periodo de 1970 a 2017 se destacan cuatro etapas en la vigilancia de laboratorio (tabla 4).

**Tabla 4** - Etapas de la vigilancia de laboratorio de dengue y otras arbovirosis en Cuba\*

Etapa	Vigilancia	Vigilancia serológica	Vigilancia virológica	Observaciones
1970-1996	Pasiva	Sueros pareados estudiados por IH A finales de los años 90 se introduce el ELISA de Captura de IgM	Aislamiento viral en ratón lactante y en cultivo de células LLCMK2, C6/36 HT y AP-61	LNR ubicado en el INHEM hasta 1980 en que IPK asume esta responsabilidad por indicación del Ministerio de Salud Pública
1997-2002	Activa	Organización paulatina de la red de laboratorios del país para el estudio de Acs IgM a dengue en monoseros mediante UMELISA-Dengue IgM  Confirmación por ELISA de IgM y de IgG (MEI) en el LNR-IPK	Aislamiento viral en células C6/36 HT  Introducción del PCR de VDEN	Normalización del UMELISA-Dengue IgM Apertura de 6 laboratorios provinciales (Santiago de Cuba, Ciudad de La Habana, Guantánamo, Pinar del Río, Villa Clara y las Tunas) con capacidad para el diagnóstico por UMELISA-Dengue IgM Confirmación del diagnóstico serológico en el LNR-IPK Identificación y caracterización del agente etiológico mediante secuenciación nucleotídica en el LNR-IPK
2003-2013	Activa			Se mantiene la vigilancia serológica de dengue. Todas las provincias con capacidad para el diagnóstico por UMELISA-Dengue IgM y Ciudad de La Habana con una red de laboratorios municipales. Confirmación del diagnóstico serológico en el LNR-IPK Identificación y caracterización molecular del agente etiológico en el LNR-IPK
2014-actual	Activa		Introducción del PCR-TR para VDEN, VCHIK, VZIK y VFA	Se mantiene la vigilancia serológica de dengue Se introduce la vigilancia molecular de VZIK, VCHIK y VFA Apertura de dos laboratorios provinciales (La Habana y Santiago de Cuba) para el diagnóstico molecular de VZIK

\* IH (técnica de inhibición de la hemaglutinación); LLCMK2 (células de mamífero); C6/36 HT (células de mosquito *Aedes albopictus*); AP-61 (células de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*); Acs (anticuerpos); LNR (Laboratorio Nacional de Referencia); INHEM (Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología); UMELISA (ultramicroelisa); LNR-IPK (Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Pedro Kourí); PCR (técnica de reacción en cadena de la polimerasa); PCR-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real); VDEN (virus dengue); VCHIK (virus chikungunya); VZIK (virus zika), VFA (viru fiebre amarilla); MEI (Método de ELISA de Inhibición)

### Primera etapa, 1970-1996

En 1972 se inician los estudios serológicos para determinar la circulación de VDEN, teniendo en cuenta la circulación en países vecinos, así como los elevados niveles de infestación de *Aedes aegypti* en el país. Estos estudios fueron conducidos por el Laboratorio de Arbovirus del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Las encuestas serológicas nacionales realizadas mostraron bajos porcentajes de positividad de Acs IH a VDEN, 0,57 % (encuesta de 1972-73), 0,87 % (encuesta de 1974) y 2,6 % (encuesta de 1975-76). Estos hallazgos apoyan que la última transmisión de dengue en el país se produjo en la década del 40

En los meses de julio y agosto de 1977, comienzan a detectarse en las provincias de Santiago de Cuba y Guantánamo, pacientes con un cuadro febril indiferenciado. En 19 de los primeros 28 pares de sueros procesados por IH a VDEN-1 y 2 se observó seroconversión de anticuerpos sugestivos de infección por alguno de los VDEN. Las muestras procedían de casos clínicamente sospechosos de dengue del Wajay (Ciudad Habana), San Antonio de los Baños (La Habana), Camaguey y Guantánamo. El aislamiento viral en cultivos de células mamífero LLCMK2 y ratones lactantes, indicó que se trataba del VDEN-1.<sup>(8)</sup>

Una vez confirmada la transmisión, se estableció el sistema de vigilancia pasivo. Sueros pareados de casos sospechosos de dengue eran enviados al Laboratorio de Arbovirus del INHEM para estudios por IH y aislamiento viral. Se observó una elevada positividad a finales de 1977 y durante 1978, la que disminuyó en los siguientes dos años para un 12,3 % de positividad en 1 523 pares de sueros procesados por la vigilancia serológica entre abril a diciembre de 1978.

La encuesta serológica de 1978-79 mostró que en 1871 sueros colectados como parte de una muestra representativa de todo el país, el 44,46 % tenía títulos de Acs IH a VDEN-1 indicativos de una infección previa con un flavivirus.<sup>(20)</sup> A mediados de 1980, por decisión del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP), el Laboratorio de Arbovirus y consecuentemente la actividad de vigilancia de laboratorio de arbovirus, se traslada al IPK pasando a este toda la actividad de referencia de arbovirus y estableciéndose como LNR.

En mayo de 1981, se detecta un número creciente de enfermos con fiebre, dolor retrocular, dolor abdominal, rash, cefalea y astenia en tres municipios del este, centro y oeste del país. Algunos casos presentaron un cuadro hemorrágico y choque. Sueros colectados de estos pacientes tenían niveles elevados de Acs IH a VDEN-1, 2 y 3 y FA sugiriendo una infección por un flavivirus. El aislamiento viral en ratones lactantes y cultivos de células de mamífero

LLCMK2 y de células de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*, AP-61 confirmó al VDEN-2 como agente etiológico de la epidemia.<sup>(21)</sup>

La vigilancia de laboratorio durante los 4 meses que duró la epidemia, incluyó el estudio mediante IH a VDEN-2 de sueros pareados y monosueros, así como el aislamiento viral en muestras colectadas de casos sospechosos de dengue.

Hasta el 24 de julio de 1981, el objetivo de la vigilancia de laboratorio fue confirmar la circulación de VDEN en nuevas localidades del país para establecer las medidas de control del vector. En esta primera etapa se procesaron más de 4 000 monosueros por serología. Hasta el 23 de septiembre, se procesaron 2 000 pares de suero de casos sospechosos lo que permitió medir la eficiencia del diagnóstico clínico. Una vez que la epidemia estuvo bajo control, la vigilancia de laboratorio se dirigió a confirmar el 100 % de los casos sospechosos de dengue. Como parte de la vigilancia virológica, se aislaron 22 cepas de VDEN-2, de ellas dos procedentes de casos de DH.

Posterior a la epidemia, la vigilancia pasiva de dengue se mantuvo, con el estudio de sueros pareados colectados de casos clínicamente sospechosos de la enfermedad. Entre 1982 a 1987 las muestras fueron procesadas por IH. A partir de 1988 se desarrollan e introducen los sistemas de Captura de IgM MAC-ELISA y MEI para la detección de Acs a VDEN.<sup>(16)</sup> Entre 1982 y 1996, de 9 543 pares de suero estudiados, solo 14 (0,14 %) mostraron seroconversión de Acs IgG a dengue. El análisis clínico y epidemiológico y la no demostración de la presencia de *Aedes aegypti* en las casas de los pacientes permitió descartar el diagnóstico de dengue. Por otra parte, estudios posteriores retrospectivos no demostraron la presencia de Acs IgM a dengue en estos casos. Estudios posteriores demostraron seroconversión de Acs neutralizantes al virus de la encefalitis de San Luis (ESL) en algunos de estos pares de suero (datos no publicados). Además, como parte de la vigilancia de sarampión y rubeola establecida en 1987, 4 983 pares de suero colectados de pacientes con fiebre y *rash* fueron estudiados a VDEN, no detectándose casos positivos.

La campaña de erradicación de *Aedes aegypti* establecida en 1981 permitió erradicar el vector en las 15 provincias del país. En la década del 90, la crítica situación económica por el recrudecimiento del bloqueo económico y la caída del campo socialista en Europa crearon condiciones favorables que condujeron a la reinfestación paulatina de varios municipios con la posibilidad de reintroducción del VDEN. En 1997, aunque *Aedes aegypti* estaba erradicado en 122 municipios, 39 municipios del país se habían reinfestado siendo las provincias más afectadas Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba y Guantánamo.<sup>(10)</sup>

## Segunda etapa, 1997-2002

A finales de 1996 el municipio Santiago de Cuba mostraba un elevado riesgo de reintroducción de VDEN por la elevada infestación del vector. En enero de 1997 la alta dirección del Ministerio de Salud Pública, las autoridades sanitarias de la provincia y el IPK, establecen una vigilancia activa (búsqueda activa de casos) en el municipio. Para ello se realizaron visitas diarias de los médicos de familia a cada uno de sus 120 domicilios, así como la búsqueda de casos con fiebre y malestar general, artralgia-mialgia, o *rash* en los hospitales de la ciudad. Una muestra de suero de cada caso sospechoso fue estudiada por el UMELISA-Dengue IgM (sistema diagnóstico y pesquisa desarrollado de conjunto entre el IPK y el Centro de Inmunoensayo (CIE) y comercializado y extendido por este último a todo el país posteriormente) en el laboratorio del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de la provincia (CPHEM-SC). Personal de este laboratorio fue previamente entrenado por personal del LNR-IPK y del CIE para enfrentar este diagnóstico. Una alícuota del suero era enviada al IPK para los estudios confirmatorios serológicos y los estudios virológicos.<sup>(10,22)</sup>

El caso índice de un brote de dengue iniciado en el área de salud 30 de Noviembre y cuyo diagnóstico fue confirmado serológicamente, se detectó el 29 de enero. En las siguientes dos semanas se confirman ocho casos más de FD.<sup>(10,22)</sup> El VDEN-2 se detecta en 3 muestras de suero mediante PCR y se aísla además en cultivo de células de mosquito C6/36 HT. Una vez confirmada la transmisión, se intensificó la vigilancia activa la que se extendió al resto de las provincias del país y no se detectó circulación viral en estas. Como parte de esta vigilancia, se establecieron otros dos laboratorios provinciales para la detección de anticuerpos IgM a dengue mediante el UMELISA-Dengue IgM, uno en Ciudad de La Habana y el otro en Guantánamo. El LNR-IPK, recibía las muestras de suero de estos laboratorios provinciales para la confirmación de la infección así como del resto del país para estudios serológicos (mediante ELISA de Captura de IgM y MEI) además de las muestras para los estudios virológicos y moleculares. En esta etapa se confirmaron en Ciudad de La Habana, Guantánamo, Granma y Cienfuegos, 17 casos de dengue importados, todos infectados en Santiago de Cuba.

En la epidemia de 1997, se reportaron más de 17 114 febriles sospechosos de dengue. Se estudiaron 9740 sueros por UMELISA-Dengue IgM en el CPHEM-SC y se confirmó la infección por el ELISA de Captura de IgM en IPK en 5 208 casos.<sup>(10)</sup> El VDEN-2 se detectó en 46 muestras de 160 procesadas por PCR y aislamiento viral. La infección por VDEN se

confirmó en 12 fallecidos de DH, de ellos el VDEN-2 se identificó por aislamiento viral y/o PCR en 11 casos. A su vez, en 11 se demostró la infección secundaria por VDEN y 11 mostraron la presencia de Acs IgM a VDEN . El último caso de la epidemia se reportó en noviembre de 1997.<sup>(22)</sup>

Entre 1998 y 2000, la vigilancia integrada de dengue se fortaleció con una vigilancia activa en policlínicos, hospitales y a nivel de los consultorios del médico de familia así como una vigilancia estricta en puertos y aeropuertos.

En este periodo solo se detectaron casos importados con la excepción de dos pequeños brotes (138 casos confirmados) de VDEN-3 y 4 a finales del 2000 en cuatro áreas de salud de tres municipios de La Habana los que fueron rápidamente eliminados.<sup>(13,23)</sup>

En junio de 2001 se confirma la transmisión de VDEN-3 en el municipio Playa de la Ciudad de La Habana. Durante las primeras ocho semanas de la epidemia, cuando el número de casos era pequeño, el objetivo de la vigilancia era detectar la transmisión en nuevas áreas de salud y municipios. En esta etapa se consideró caso confirmado aquel con una IgM positiva en el suero colectado al 6to día de la fiebre y la seroconversión de anticuerpos IgG por MEI en el suero pareado. Frente al incremento en el número de enfermos, se consideró caso confirmado aquel con Acs IgM determinado por ELISA de Captura de IgM en el LNR-IPK. En una segunda etapa, cuando el número de casos se incrementó más, se consideró caso confirmado aquel con presencia de Acs IgM mediante UMELISA-Dengue IgM.<sup>(12)</sup>

Al extenderse la transmisión a otras provincias, el diagnóstico serológico mediante UMELISA-Dengue IgM se extendió a seis laboratorios más, tres de ellos ubicados en Ciudad de La Habana y el resto en las provincias Pinar del Río, Villa Clara y Las Tunas.<sup>(11)</sup> En 2001, como parte de la vigilancia se procesaron 128 924 muestras de suero en todo el país y se confirmó la infección en el 11,3 % de los casos. El 65 % de las muestras procedían de Ciudad de La Habana. La vigilancia virológica molecular permitió identificar 91 aislamientos de VDEN-3 en muestras colectadas al inicio, medio y final de la epidemia la que se dió por eliminada en marzo de 2002.<sup>(11)</sup>

### Tercera etapa, 2002-2013

Entre los años 2002 al 2013 se ha mantenido una intensa vigilancia de dengue con búsqueda activa de casos sospechosos a nivel de la atención primaria de salud. El incremento del dengue en la región de las Américas, el incremento en el arribo de personas procedentes de áreas endémicas en este periodo, los factores condicionantes del aumento de los índices de infestación del vector, ha conducido a un incremento del riesgo de introducción y transmisión viral. En esta etapa se han reportado brotes en varios municipios y provincias, por lo que paulatinamente se fueron estableciendo laboratorios provinciales con capacidad para desarrollar la vigilancia serológica utilizando el UMELISA-Dengue IgM en sueros colectados al 6to día de la fiebre de casos clínicamente sospechosos. Como parte de la vigilancia serológica, todos los sueros positivos y el 10 % de los negativos se envían al LNR-IPK para su confirmación mediante el ELISA de Captura de IgM. En los casos en que se confirma la presencia de Acs IgM a dengue mediante el ELISA de Captura de IgM se solicita una segunda muestra de suero para estudio por MEI de Acs IgG en el suero pareado para la confirmación final del resultado.

La vigilancia virológica-molecular para conocer el serotipo(s) circulante, se ha establecido cuando hay sospecha de inicio de transmisión o frente a un incremento en la positividad de las muestras positivas de Acs IgM a dengue en un área de salud o municipio. Para el diagnóstico como parte de esa vigilancia, se utilizó el protocolo de PCR anidada múltiple de punto final publicado por *Lanciotti* y otros, en 1992, que permite identificar el serotipo infectante en diferentes muestras clínicas.<sup>(24,25)</sup> También se utilizó el aislamiento viral en cultivo de células de mosquito C6/36 HT.

La vigilancia virológica-molecular se dirigió al estudio de sueros de casos sospechosos de dengue, colectados en la fase aguda de la enfermedad (en los primeros 5 días tras la aparición de los primeros síntomas), así como de casos graves o fallecidos, en los que se sospechó el dengue como causa de muerte. En estos últimos se estudiaron vísceras (principalmente hígado y bazo) para llegar al diagnóstico etiológico de la infección por VDEN. Una vez confirmada la epidemia e identificado el agente etiológico, se indica: a) el envío mensual de 10 muestras de casos sospechosos de dengue en la fase aguda de la enfermedad por provincia para el seguimiento virológico-molecular de la epidemia (caracterización genética del virus circulante, identificación de la introducción de nuevos serotipos y genotipos etc), y b) el envío de muestras del 100 % de los casos graves, fallecidos y de casos con miocarditis y cuadros neurológicos.

Similar a las etapas anteriores, hasta el 2013, una vez que una epidemia o brote era confirmado y en dependencia del número de casos, se consideró caso confirmado todo aquel que clínica y epidemiológicamente era compatible con dengue con un resultado positivo por ELISA de Captura de IgM. En dependencia del número de casos, este criterio se extendió a los casos positivos por UMELISA-Dengue IgM, enviándose solo el 10 % de las muestras positivas al LNR-IPK como control de calidad, así como los sueros con niveles bajos de reactividad por UMELISA-Dengue IgM. Con posterioridad a 2013, todos los casos positivos por UMELISA-Dengue IgM son enviados al LNR-IPK para confirmación mediante ELISA de Captura de IgM y MEI en el suero pareado.

En esta etapa, la vigilancia del virus del Nilo (VNO) es establecida en Cuba a partir de su introducción en EUA en 1999 y su extensión posterior. Se realiza una búsqueda activa de casos de encefalitis de etiología viral desconocida en pacientes mayores de 30 años de edad. En sus inicios el diagnóstico fue serológico, y se incorporó posteriormente el diagnóstico virológico-molecular. La vigilancia incluye el estudio de sueros y LCR colectados en la fase aguda de la enfermedad y la colección de segundas muestras de suero en la fase convaleciente. La determinación de Acs IgM e IgG al VNO fue realizada utilizando un estuche comercial (Focus Technologies, Cypress, CA, USA). Las muestras positivas de Acs IgM específicos a VNO fueron consideradas como casos probables de infección a dicho virus; aquellas positivas de anticuerpos IgG eran estudiadas para la determinación de anticuerpos a los VDEN y al virus de la encefalitis de San Luis (ESL).

La confirmación serológica se llevó a cabo mediante el ensayo de neutralización por reducción del número de placas utilizando las cepas VNO (NY99, Ontario, Canadá, aislamiento 2001), VDEN-2, NG-C y San Luis (Parton, Type Culture Collection catalog no. VR-1265) en colaboración con el Laboratorio Nacional de Microbiología de Winnipeg, Canadá. Los tres primeros casos confirmados de infección por el VNO provenían de la vigilancia en 2003 y 2004. Los casos confirmados de 2003 mostraron un cuadro febril, debilidad muscular y encefalitis.<sup>(26)</sup> Estudios posteriores demostraron en uno de ellos la síntesis intratecal de anticuerpos IgM, IgA e IgG sugiriendo la posible disfunción de la barrera hematoencefálica. Hasta 2006, fueron confirmados serológicamente 16 casos de infección al VNO, la mayoría de ellos provenientes de la provincia Sancti Spíritus. La vigilancia de laboratorio del VNO contribuyó a la notificación de casos de infección por el virus de la ESL y a la confirmación de un ciclo de amplificación zoonótica desde aves residentes a equinos y al hombre entre 2002 y 2003 en esta provincia. Con posterioridad a

2006, se han reportado casos positivos de IgM a VNO aunque la confirmación serológica por ensayo de neutralización no ha podido realizarse dada la necesidad de enviar las muestras a un laboratorio de referencia con nivel de contención III. La vigilancia de VNO se mantiene en la actualidad aunque esta entidad no constituye un problema de salud.

### **Etapa actual, 2014-2017, vigilancia de dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla**

En este periodo, la vigilancia serológica y molecular de dengue se mantuvo siguiendo las mismas pautas que en la etapa anterior. No obstante, para unificar la plataforma a emplear en la vigilancia molecular de los diferentes arbovirus, se implementó en el LNR de arbovirus del IPK, el protocolo publicado por *Santiago* y otros, en 2013.<sup>(27)</sup> Este protocolo permite identificar mediante PCR-TR los cuatro virus del complejo dengue en un mismo tubo de reacción, utilizando muestras de suero y plasma.

Dando respuesta a la situación epidemiológica de la región, en abril de 2014 se estableció la vigilancia molecular del VCHIK y en febrero de 2016 la del VZIK. Desde abril de 2014 hasta diciembre de 2017 se procesaron 1 856 muestras como parte de la vigilancia molecular del VCHIK (280 en 2014, 178 en 2015, 1 280 en 2016 y 118 hasta diciembre de 2017). En sus inicios (2014-2015), para la vigilancia molecular del VCHIK se utilizó el protocolo de PCR-TR publicado por *Panning* y otros, en 2009.<sup>(28)</sup> Posteriormente, y respondiendo a la estrategia regional de vigilancia de la RELDA (Red de Laboratorios Nacionales de Arbovirus de las Américas) en aras de armonizar la vigilancia del VCHIK se normalizó en el LNR-IPK el protocolo de PCR-TR confirmatorio de la infección por VCHIK, desarrollado en la División de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Fort Collins, Colorado.<sup>(29)</sup>

En febrero de 2016 se establece en Cuba la vigilancia molecular del VZIK. Esta se dirigió al estudio de viajeros procedentes de zonas en la que se había notificado circulación autóctona de este virus, así como en casos con sospecha clínica de enfermedad por zika. En julio del mismo año se confirmó la transmisión autóctona de VZIK en el país y a partir de este momento la vigilancia se dirigió al estudio de:

- casos sospechosos de enfermedad por zika para identificar nuevas áreas con transmisión,
- estudio de embarazadas clínicamente sospechosas de la enfermedad
- estudio de embarazadas sanas que residen en un área de 300 m<sup>2</sup> alrededor de un caso confirmado de zika
- estudio de casos con síndrome de Guillain Barré (SGB) procedentes de áreas con transmisión,
- estudio de neonatos con sospecha de una infección congénita y
- estudio de recién nacidos hijos de madres con infección confirmada por VZIK durante el embarazo.

Para desarrollar la vigilancia molecular del VZIK, se normalizaron en el LNR de Arbovirus del IPK, diferentes protocolos de PCR-TR, entre ellos, el que utiliza el segundo juego de cebadores y sonda diseñado por *Lanciotti* y otros<sup>(30)</sup> y el protocolo de PCR-TR Trioplex del CDC.<sup>(31)</sup>

Inicialmente, para los estudios moleculares de VZIK, se indicó la toma de una muestra de suero colectada durante la fase aguda de la enfermedad. Teniendo en cuenta los reportes de otros autores que describían una viremia corta y con cifras de carga viral muy bajas así como algunos reportes de casos en los que se detectó el ARN del VZIK en la orina tras la desaparición de las manifestaciones clínicas, el LNR-IPK comenzó a investigar la posible utilidad de este fluido para el establecimiento de la vigilancia molecular. De esta forma se comprobó la excreción del ARN del ZIKV en orina hasta 21 días después del inicio del cuadro clínico, por lo que se indicó la colecta de una muestra de suero y de orina para los estudios diagnósticos de VZIK permitiendo identificar un mayor número de casos en comparación con las muestras de suero (datos no publicados).

Hasta noviembre de 2016, todas las muestras fueron procesadas en el LNR-IPK. A finales de noviembre de 2016 y en enero de 2017 se extiende el diagnóstico molecular a los Laboratorios Provinciales de La Habana y Santiago de Cuba (este último asume el diagnóstico de las provincias Guantánamo, Santiago de Cuba, Granma, Holguín y Las Tunas). Entre febrero de 2016 y noviembre de 2017, el LNR-IPK ha procesado 98 349

muestras recibidas a través de la vigilancia molecular de VZIK (38 544 en 2016 y 59 805 hasta diciembre de 2017).

A partir de la emergencia de la FA, primero en Angola 2015-2016<sup>(32)</sup> y después en Brasil en 2016-17,<sup>(33)</sup> también se incorporó la vigilancia molecular del VFA tras la normalización en el LNR-IPK del protocolo de PCR-TR utilizando el juego de cebadores y sonda publicados por *Mantel* y otros en 2008.<sup>(34,35)</sup> Entre 2016-2017 el LNR-IPK ha procesado muestras de viajeros procedentes de áreas con riesgo, todas negativas.

La vigilancia de arbovirus en este periodo ha permitido identificar la transmisión autóctona de VZIK en varias provincias y confirmar la infección en pacientes con sospecha clínica de enfermedad por zika, embarazadas sintomáticas y asintomáticas, así como en muestras colectadas de individuos sanos para pesquisa del virus. Hasta el momento no se ha confirmado transmisión de VCHIK aunque sí la infección en viajeros procedentes de áreas endémicas. La circulación de VDEN se ha mantenido aunque en niveles inferiores a los de años anteriores.

## **PAPEL DEL IPK COMO LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE ARBOVIRUS**

Desde la designación del IPK como LNR de arbovirus del MINSAP en 1980, los esfuerzos se han dirigido a: a) montaje, introducción y extensión de la tecnología diagnóstica más moderna en dependencia del momento epidemiológico nacional y regional y el desarrollo tecnológico del momento; b) la capacitación del personal del LNR y de los laboratorios de los CPHEM del país así como de instituciones en el exterior; c) desarrollo de la actividad de diagnóstico, vigilancia y referencia del país recomendando las pautas de la vigilancia de laboratorio y los algoritmos diagnósticos; y d) desarrollo de investigaciones dirigidas a un mejor conocimiento de la situación epidemiológica, la caracterización de los riesgos y el fortalecimiento de la vigilancia de laboratorio.

Entre los principales resultados obtenidos en estos más de 40 años se destacan:

- La normalización e introducción de varios sistemas de diagnóstico serológico como el ELISA de Captura de IgM (MAC-ELISA),<sup>(16)</sup> el ELISA de IgG, MEI,<sup>(15)</sup> la colaboración con el CIE para la normalización del UMELISA-Dengue IgM, que ha sido producido, extendido y comercializado por este, <sup>(18,36)</sup> la preparación de antígenos de dengue utilizados en los sistemas serológicos antes mencionados, la normalización e introducción de la técnica de neutralización por reducción de placas para VDEN y FA;<sup>(37)</sup> la normalización e introducción de los sistemas de PCR para VDEN flavivirus, alfavirus y VNO;<sup>(38)</sup> la normalización e introducción de los sistemas de PCR-TR para VDEN, VCHIK, VFA y VZIK;<sup>(27,34)</sup> la introducción de los cultivos celulares de mosquitos<sup>(39)</sup> y de los Acs monoclonales para el aislamiento e identificación viral de VDEN, VNO, VZIK; y la introducción de la técnica de *shell* vial para el aislamiento del VDEN<sup>(25)</sup> entre otros métodos.
- La evaluación de sistemas comerciales y no comerciales para la detección de Acs IgM, IgA e IgG a VDEN;<sup>(40,41)</sup> y la detección de la proteína NS1 de VDEN.<sup>(42,43)</sup> Además se han evaluado varias actualizaciones debido a mejoras introducidas en el diagnosticador UMELISA-Dengue IgM.<sup>(18,36)</sup>
- La evaluación de estuches comerciales para la detección de anticuerpos IgM y la proteína NS1 de virus dengue en estudios multicentros desarrollados por la Organización Mundial de la Salud, OMS.<sup>(44,45)</sup>
- La normalización de los sistemas MAC-ELISA y MEI para detección de anticuerpos IgM e IgG contra FA en individuos vacunados.
- El desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos para el tamizaje primario de anticuerpos monoclonales y su aplicación en el diagnóstico e investigación
- La evaluación de la utilidad de diferentes muestras clínicas (suero, saliva, orina y sangre colectada en papel de filtro) para el diagnóstico serológico de VDEN;<sup>(16,40,46)</sup> de suero, papel de filtro, tejidos en parafina para el diagnóstico molecular de VDEN; y de suero, orina, LCR, líquido amniótico, tejidos y semen para el diagnóstico molecular de VZIK.<sup>(47,48)</sup>
- Los estudios cinéticos de marcadores virológicos y serológicos para VDEN y VZIK en muestras colectadas de casos sospechosos.<sup>(40,42)</sup>

- Los estudios de caracterización genética por restricción enzimática y secuenciación nucleotídica incluyendo Secuenciación de Genoma Amplio de VDENV y más recientemente de VCHIK y VZIK (datos no publicados). Estudios relacionados con el virus de la encefalitis de San Luis, encefalitis equina del este y del oeste.
- La capacitación de personal cubano y de otras regiones geográficas en las técnicas para el diagnóstico y la vigilancia de laboratorio de los arbovirus. Se destacan los entrenamientos, la tutoría de tesis de diploma, de especialidad de Microbiología y de Inmunología, de maestrías y doctorados y el Curso Internacional de Dengue. Este último se desarrolla cada 2 años y cuenta con 15 ediciones realizadas entre 1987-2017, con 2 820 participantes, de ellos 1 330 cubanos y 1 490 extranjeros procedentes de 70 países. Otra actividad de importancia es la asesoría para la extensión del diagnóstico por UMELISA-Dengue IgM y más recientemente la asesoría para la apertura de dos laboratorios para el diagnóstico molecular de arbovirus en el país.
- El desarrollo de la actividad de diagnóstico, vigilancia de laboratorio y referencia nacional que ha permitido la identificación, el seguimiento, la caracterización de las situaciones epidemiológicas, la certificación del cese de transmisión y los alertas al Sistema Nacional de Salud durante más de 30 años.<sup>(8-11,49)</sup>
- El aporte de datos para la mejor caracterización de la situación epidemiológica de dengue y más recientemente de zika y chikungunya y la toma de decisiones.
- El desarrollo de investigaciones que han brindado nuevo conocimiento y que apoyan la vigilancia de laboratorio y el mejor enfrentamiento de la enfermedad. Entre ellas las encuestas seroepidemiológicas, los estudios de factores de riesgo de DH incluyendo el papel de la infección secundaria por dengue, los estudios dirigidos a profundizar en la inmunidad de la enfermedad y de la influencia de la genética del individuo en la severidad clínica, la caracterización del agente viral y su evolución entre otros.<sup>(49,50,51,52,53)</sup>
- El apoyo a otros países de la región en recursos humanos, reactivos, asesorías para el enfrentamiento de situaciones de emergencia.
- El papel del LNR-IPK como parte del Centro Colaborador de la OMS/OPS para el estudio de las enfermedades víricas inicialmente (1994-2008) y para el estudio del dengue y su vector (2008-actual).

- El papel del LNR-IPK en la coordinación de la Red de Laboratorios Nacionales de Dengue en las Américas, RELDA-OPS (2008-2015) y en la coordinación de la Red de Laboratorios Nacionales de Arbovirus en las Américas, RELDA-OPS (2016-actual).<sup>(54)</sup>

Por estos resultados, el IPK ha sido reconocido a través de numerosos premios otorgados por la Academia de Ciencias de Cuba y el Ministerio de Salud Pública.

## MOMENTO ACTUAL, RETOS Y PERSPECTIVAS

Las enfermedades virales transmitidas por vectores y en particular el dengue, la enfermedad por zika y la fiebre chikungunya constituyen hoy uno de los principales retos de salud a nivel mundial. Reportes recientes estiman anualmente un total de 390 millones de infecciones por VDENV de las que aproximadamente un tercio son sintomáticas, estando presente en Sudeste Asiático y Pacífico Occidental, Las Américas, África y Mediterráneo Oriental.<sup>(55)</sup>

La extensión en la década del 2000 de los VCHIK y VZIK de sus áreas habituales de transmisión en África hacia otras regiones geográficas ha impuesto nuevos retos, pues la mayor parte de la población ubicada en áreas con presencia del vector son susceptibles a estas infecciones al no contar con inmunidad previa. Otro gran reto es el elevado número de países que están en riesgo de circulación de las tres enfermedades entre los que se destacan los de la región de Las Américas, donde cocirculan actualmente los VDENV, VZIK y VCHIK. Agravando esta situación está el peligro de urbanización de la FA que de producirse, no se contaría con suficientes dosis de vacuna para un control inmediato.

En este escenario, Cuba no escapa de estos riesgos. A pesar de contar con un fuerte sistema de vigilancia y control vectorial, el intenso intercambio de personal procedente de países endémicos, y los factores ambientales que favorecen la cría del vector, hacen que estas enfermedades constituyan un riesgo constante, por lo que se necesita del fortalecimiento de las acciones de vigilancia, prevención y control.

La vigilancia de laboratorio como parte de la vigilancia integrada es un elemento fundamental en la identificación, confirmación, seguimiento, estudio de las epidemias y de los pacientes afectados por estas entidades, aspecto clave en su mejor control y prevención.

En estos más de 40 años, la vigilancia de laboratorio en Cuba ha evolucionado para dar respuesta a la situación epidemiológica y a las necesidades del país.

Hoy, en el país se realiza la vigilancia serológica de dengue para lo cual dispone de una red de laboratorios provinciales incluyendo laboratorios municipales (en la capital) y en varios hospitales. La red utiliza el UMELISA-Dengue IgM, sistema de pesquisa desarrollado en el país (tabla 5).<sup>(18)</sup> Esta red de laboratorios tributa sus resultados al LNR-IPK para la confirmación de los casos mediante el ELISA de Captura de IgM y el estudio de sueros pareados mediante el MEI. Dada la co-circulación de VDEN y de VZIK, un caso serológicamente positivo debe de ser considerado un caso positivo de infección por flavivirus.

**Tabla 5** - Vigilancia serológica de dengue en casos clínicamente sospechosos de dengue\*

Muestra	Red de Laboratorios SUMA			LNR-IPK			
	Estudio	Resultado	Control de calidad y confirmación	Estudio	Resultado	Estudio**	Interpretación***
Suero colectado al 6to día de la fiebre	Estudio de Acs IgM a dengue por UMELISA-Dengue IgM	IgM negativo (caso negativo)	Envío del 10 % de las muestras al LNR-IPK	Estudio de Acs IgM por ELISA de Captura	IgM negativo (caso negativo)	-	Caso confirmado si seroconversión de Acs entre ambos sueros
		IgM positiva (caso probable)	Envío del 100 % de las muestras al LNR-IPK		IgM positiva	Estudio de par de sueros** por MEI	

\*LNR-IPK (Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Pedro Kouri); Acs (anticuerpos); UMELISA (sistema ultramicroanalítico); MEI (Método de ELISA de Inhibición).

\*\*Par de sueros: 1er suero colectado en los primeros 6 días de la fiebre y 2do suero colectado entre 15 y 21 días del 1er suero. \*\*\*En algunas situaciones epidemiológicas se ha asumido como caso confirmado aquel con un resultado IgM positivo por ELISA de Captura de IgM o incluso por UMELISA-Dengue IgM

(VDEN o VZIK) ya que sistemas estos serológicos capaces de detectar Acs IgM e IgG a ambos agentes. Además, se cuenta con la vigilancia molecular la que se ha fortalecido y complementado con la introducción de varios sistemas moleculares para la detección de diferentes agentes virales (tabla 6). Como parte de la vigilancia molecular, se estudian muestras de pacientes sospechosos de infección por VDEN, VZIK, VCHIK y VFA mediante PCR-TR tanto en los laboratorios provinciales de La Habana y Santiago de Cuba como en el LNR-IPK.

**Tabla 6 - Vigilancia molecular de dengue, zika, chikungunya y fiebre amarilla\***

Caso clínicamente sospechoso de infección por	Muestra	Estudio	Resultado	Observaciones
V DEN	Suero	PCR/TR	En casos con PCR/TR negativo no se descarta la infección	En fallecidos con sospecha de infección por alguno de estos arbovirus se estudian además, muestras de hígado, bazo, cerebro, ganglio
V CHIK				
FA**				
V ZIK***	Suero y orina		En casos con PCR/TR positivo se confirma la infección	Estudio de suero, orina y LCR en casos de SGB Estudio de suero y orina en neonatos hijos de mujeres positivas a VZIK durante el embarazo. Estudio de suero, orina, placenta y sangre de cordón y cordón umbilical en mujeres positivas a VZIK colectadas al momento del parto

\*VDEN (virus dengue); VCHIK (virus chikungunya); FA (fiebre amarilla); VZIK (virus zika); PCR/TR (técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real); LCR (líquido cefalorraquídeo); SGB (síndrome de Guillain Barré)

\*\*La vigilancia de FA está dirigida al estudio de viajeros procedentes de áreas con transmisión. \*\*\*La vigilancia de zika está dirigida al estudio de casos sospechosos de la enfermedad incluyendo embarazadas, pacientes con SGB y embarazadas con antecedentes de salud pero que viven en un área de 300 m<sup>2</sup> alrededor de un caso confirmado de zika.

A pesar de estos avances, se necesita del continuo fortalecimiento de la vigilancia de laboratorio y de su mayor inserción en el marco de la vigilancia integrada. Para ello las acciones deben dirigirse a:

- Extensión del diagnóstico molecular actual a otras provincias que permita una mayor cercanía del diagnóstico al paciente.
- Desarrollo de sistemas serológicos tanto en formato ELISA como UMELISA que permita la detección de Acs IgM e IgG a VZIK. Idealmente, sistemas que sean capaces de discriminar entre ambas infecciones (dengue y zika).
- Desarrollo de tiras rápidas para el diagnóstico de VDEN y VZIK con una adecuada sensibilidad, especificidad y bajo costo que permita el diagnóstico temprano del caso para su mejor manejo terapéutico, así como el seguimiento de la embarazada durante la gestación.
- Desarrollo de sistemas moleculares que permita la detección del ácido nucleico de VDEN y VZIK en una misma prueba a un bajo costo.
- Estudio de la cinética de los marcadores virológicos y serológicos durante una infección por VZIK en pacientes con diferentes antecedentes inmunológicos (casos primarios y secundarios de dengue) incluyendo la embarazada.
- Evaluación de estuches diagnósticos comerciales.
- Preparación de paneles de sueros y otras muestras para ser utilizadas en los estudios anteriormente propuestos.

- Desarrollo e implementación de nuevos algoritmos diagnósticos en dependencia de la tecnología disponible y de la situación epidemiológica nacional.
- Reorganización de la vigilancia de laboratorio a nivel de país con el establecimiento de laboratorios regionales de referencia que tribute al LNR-IPK. Este debe de jugar un papel principal en la introducción de nuevas tecnologías diagnósticas, búsqueda y diagnóstico de nuevos agentes, caracterización molecular de estos y fortalecimiento de la actividad de referencia de los arbovirus en el país, además del fortalecimiento del sistema de transporte de muestras y la informatización del sistema.

En este contexto, el IPK, como centro de referencia nacional, de conjunto con otros centros de investigación y unidades del Sistema Nacional de Salud tiene el reto de continuar introduciendo métodos novedosos de diagnóstico no solo para estos agentes sino para otros potenciales arbovirus emergentes como Mayaro, Oropouche, UCSU. A su vez, tiene el reto y la responsabilidad de asesorar a las autoridades nacionales sobre las mejores estrategias a seguir en la vigilancia, prevención y control de las enfermedades transmisibles.

### **Dedicatoria**

Los autores desean dedicar este trabajo a los Profesores Pedro Mas Lago (1931-2012) y Gustavo Kourí Flores (1936-2011), quienes fueron artífices de la vigilancia de los arbovirus en Cuba.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a todos los que en el transcurso de estas décadas han participado en el enfrentamiento del dengue y de otros arbovirus en el país. Agradecen además a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por su apoyo en la vigilancia de laboratorio de dengue y de otros arbovirus.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers. 2016;18(2):16055.

2. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med.* 2016 Nov;17(6):671-9.
3. PAHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication. Pan American Health Organization Scientific advisory committee on dengue Third meeting Mayo. 1994;548.
4. Guzman MG. Thirty years after the Cuban hemorrhagic dengue epidemic of 1981. *MEDICC review.* 2012;14(2):46-51.
5. OPS. Número de casos reportados de Chikungunya en países o territorios de las Américas, 2014 *Semana Epidemiológica* 2014 29 diciembre;52.
6. PAHO/WHO. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2017. Cumulative cases. [cited 2017 Oct 24]. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en)
7. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. COES – Febre Amarela . Centro de Operacoes de emergencia em Saude Publica sobre Febre Amarela. Informe No. **43/2017** [cited 2017 Oct 24]. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/02/COES-FEBRE-AMARELA--INFORME-43---Atualiza---o-em-31maio2017.pdf>
8. Mas Lago P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication. 1979;375:40-3.
9. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization.* 1989;67(4):375-80.
10. Valdes L, Guzman MG, Kouri G, Delgado J, Carbonell I, Cabrera MV, et al. La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 1999;6(1):16-25.
11. Guzman MG, Pelaez O, Kouri G, Quintana I, Vazquez S, Penton M, et al. Caracterización final y lecciones de la epidemia de dengue 3 en Cuba, 2001-2002. . *Revista Panamericana de Salud Pública.* 2006 Apr;19(4):282-9.

12. Pelaez O, Guzman MG, Kouri G, Perez R, San Martin JL, Vazquez S, et al. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerging Infectious Diseases*. 2004 Apr;10(4):719-22.
13. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002 Jan;2(1):33-42.
14. OPS. Brote de dengue en Cuba, 2006. *EER Noticias: enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de las Américas*. 2006;3(24).
15. Vazquez S, Bravo JR, Perez AB, Guzman MG. ELISA de Inhibición. Su utilidad para clasificar un caso de dengue. *Rev Cuba Med Trop*. 1997;49(2):108-12.
16. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman MG. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1998;3(3):174-8.
17. Guzman MG, Buchy P, Enria D, Vazquez S. Laboratory diagnosis of dengue. In: Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Wallingford, UK: CAB International; 2014.
18. Vazquez S, Valdivia I, Sanchez A, Calzada N, Guzman MG. Evaluación del sistema diagnóstico UMELISA Dengue IgM PLUS. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* 2007;5(1):4-18.
19. MINSAP. Guías cubanas para la atención integral a pacientes con dengue. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2012.
20. Cantelar N, Albert L, Balbis E. Circulación de dengue en Cuba, 1978-1979. *Rev Cuba Med Trop*. 1981;33(1):72-8.
21. Morier Diaz L, Aleman Miranda MR, Castillo Alvarez A, Perez Forcada V. Preliminary study of AP-64 cell line (*Aedes pseudoscutellaris*) for dengue-1 and -2 virus multiplication. *Rev Cuba Med Trop*. 1991;43(3):156-61.
22. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerging Infectious Diseases*. 1998 Jan-Mar;4(1):89-92.
23. Guzman MG, Valdes L, Pelaez O. Dengue en Cuba. In: Guzman MG, editor. *Dengue*. La Habana, Cuba. 2014. p. 62-89.

24. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992 Mar;30(3):545-51.
25. Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 Sep;38(9):3508-10.
26. Pupo M, Guzmán MG, Fernández R, Llop A, Dickinson FO, Pérez D, et al. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(6):1022-4.
27. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(7):e2311.
28. Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C. Performance of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(9):3014-6.
29. Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis*. 2016 Dec 15;214(Suppl 5):S471-s4.
30. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor LdC. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(5):933-5.
31. Triplex Real-time RT-PCR Assay Centers for Disease Control and Prevention [cited 2017 Oct 24]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/safety/emergencysituations/ucm491592.pdf>
32. Grobbelaar AA, Weyer J, Moolla N, Jansen van Vuren P, Moises F, Paweska JT. Resurgence of Yellow Fever in Angola, 2015-2016. *Emerging Infectious Diseases*. 2016 Oct;22(10):1854-5.

33. Khan AW, Nasim Z, Zahir F, Khan MA, Ali A, Ali S, et al. Resurgence of yellow fever in Brazil: Overview and possible control options. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2017;64(3):353-6.
34. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *Journal of Virological Methods*. 2008 Jul;151(1):40-6.
35. Emergencies preparedness, response. Yellow fever – Angola. *Disease Outbreak News*. 2016 June 14 [cited 2017 Oct 24]. Available from: <http://www.who.int/csr/don/14-june-2016-yellow-fever-angola/es>
36. Valdivia I, Palenzuela A, Herrera R, Silva C, Feal S, Alcántara D, et al. UMELISA Dengue IgM PLUS: Nuevo ensayo para la detección de IgM anti-Dengue por SUMA. *Rev Latinoamericana de Microbiología*. 2002;44(4).
37. Alvarez Vera M, Gonzalez Rodriguez A, Diaz Morejon D, Morier Diaz L, Guzman Tirado MG. Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Revista Cuba Med Trop*. 2010 May-Aug;62(2):138-45.
38. Rosario D, Alvarez M, Diaz J, Contreras R, Rodriguez R, Vazquez S, et al. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida y determinación del serotipo de virus del dengue en muestras clínicas. *Revista Panamericana de Salud Pública* 1998;4(1):1-5.
39. Morier L, Camacho DE, Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Comach G. Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue-2 en 2 líneas celulares de mosquitos *Rev Cub Med Trop*. 2000;52(3):215-9.
40. Vazquez S, Cabezas S, Perez AB, Pupo M, Ruiz D, Calzada N, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *International journal of Infectious Diseases*. 2007 May;11(3):256-62.
41. Ruiz D, Vazquez S, Rios HC, Calzada N, Guzman MG. Immunoglobulin A Antibody Responses in Patients with Primary or Secondary Dengue Infections. *Open Access Library Journal*. 2016;3:e3212.

42. Vazquez S, Ruiz D, Barrero R, Ramirez R, Calzada N, del Rosario Pena B, et al. Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010 Sep;68(1):46-9.
43. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(8):1-10.
44. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging Infectious Diseases*. 2009 Mar;15(3):436-40.
45. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(10):1-11.
46. Vazquez S, Fernandez R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de Inhibición. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1991 Jul-Aug;33(4):309-11.
47. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of Virological Methods*. 2005 Apr;125(1):75-81.
48. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodriguez AJ, Gonzalez E, Frontela MD, Guzman MG. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. *Rev Cub Med Trop*. 1997;49(2):100-7.
49. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008 Jun;102(6):522-3.
50. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006 Dec;75(6):1113-7.

51. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. American Journal of Epidemiology. 2000 Nov 1;152(9):793-9.
52. Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, Rosario D, Alvarez M, Kouri G, et al. Virus role during intraepidemic increase in dengue disease severity. Vector Borne and Zoonotic Diseases. 2011 Jun;11(6):675-81.
53. Limonta D, Falcon V, Torres G, Capo V, Menendez I, Rosario D, et al. Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. Infection. 2012 Dec;40(6):689-94.
54. RELDA - Antecedentes. Cronología de la Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus de las Américas (RELDA) [cited 2017 Oct 24]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12904%3Arela-background-information&catid=8990%3Arela-network-&Itemid=42243&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12904%3Arela-background-information&catid=8990%3Arela-network-&Itemid=42243&lang=es)
55. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7.

### Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflicto de intereses en relación con el artículo.

\* Los autores desean dedicar este trabajo a los profesores Pedro Mas Lago (1931-2012) y Gustavo Kourí Flores (1936-2011), quienes fueron artífices de la vigilancia de los arbovirus en Cuba.