

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE AISLADO DE
PACIENTES DEL HOSPITAL CENTRAL DEL INSTITUTO DE PREVISIÓN SOCIAL
ENTRE FEBRERO Y JUNIO DEL 2011**

ALEJANDRA ROJAS SEGOVIA

Tesis presentada al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica y Dirección General de Postgrado de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas

ASUNCIÓN – PARAGUAY

2013

Universidad Nacional de Asunción
Dirección General de Postgrado
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

*“Epidemiología molecular del virus del dengue aislado de pacientes del Hospital Central del
Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011”*

Trabajo de Tesis para optar por el título de Magíster en Ciencias Biomédicas

Autora: Alejandra Rojas Segovia

Director de tesis: Dr. Víctor Aquino, PhD

Co-directoras de tesis: Dra. Laura Mendoza, PhD

Dra. Yvalena de Guillén

Asunción, Paraguay

Marzo - 2013

Catalogado por: Biblioteca del IICS

Rojas Segovia, Alejandra

Epidemiología molecular del virus del dengue aislado de pacientes del Hospital Central del Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011 / Alejandra Rojas Segovia ; dir de tesis Víctor Aquino; co dir Laura Mendoza; Yvalena Arévalo de Guillén. -- Asunción : UNA. Dirección General de Posgrado. Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. IICS, 2013.

104 p. : il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) -- IICS, 2013

1. Dengue. 2. Epidemiología molecular. 3. Diversidad genética . I. Título

CDD (ed. 18ª) 616.921

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE AISLADO DE
PACIENTES DEL HOSPITAL CENTRAL DEL INSTITUTO DE PREVISIÓN SOCIAL
ENTRE FEBRERO Y JUNIO DEL 2011**

ALEJANDRA ROJAS SEGOVIA

Aprobado en fecha 18 de marzo de 2013.

Tribunal examinador:

Dra. Erna Geessien Kroon, Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.

Dra. Eva Nara, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, IICS-UNA, Asunción, Paraguay.

MSc. Emilio Espínola, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, IICS-UNA, Asunción, Paraguay

Dr. Víctor Aquino
Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto
Universidad de San Pablo, Brasil
Director de tesis

Agradecimientos

A mi esposo Javi y mi hijo Nico, por su apoyo constante y comprensión durante todo este tiempo y por motivarme día a día para seguir adelante.

A mis padres Claudio y Mirta, a mis hermanos Montse, Clau y Pili, y a Lore, por ser mi soporte en todo momento y poner cada uno su granito de arena en este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Víctor Aquino porque gracias a su apoyo y orientación pudo llevarse a cabo este proyecto.

A mis co-directoras de tesis, Dra. Laura Mendoza y Dra. Yvalena de Guillén por su valiosa ayuda en la orientación de este trabajo.

A la Dra. Ma. Asunción Vallejos y la Dra. Lilian Herebia del Instituto de Previsión Social (IPS) por su estrecha colaboración y por abrirme las puertas de su laboratorio. Al equipo de profesionales del Laboratorio de Urgencias de IPS por su contribución en la toma de muestras.

A Alberto y Adriana, por todo el apoyo brindado, sin su ayuda este trabajo no hubiese sido posible. A los amigos del Laboratorio de Virología (FCFRP-USP) por su colaboración y por hacerme formar parte de su laboratorio.

A mis compañeros del Departamento de Producción del IICS, Tere, Laura, Maru, Maglo y Oscar quienes colaboraron de manera incondicional en este trabajo. A Carmen por introducirme al mundo del virus del dengue.

A la Dra. Graciela Velázquez, directora del IICS, por el apoyo institucional y por la confianza para la realización de este proyecto.

A la jefa del Departamento de Biología Molecular y Genética del IICS, Dra. Graciela Russomando por permitirme realizar las actividades en el laboratorio a su cargo. A los compañeros de dicho Dpto. por su ayuda en este proyecto, en especial a Emilio, Magaly y Eva por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A mis compañeras de maestría, por recorrer juntas este camino difícil pero al final, gratificante.

A mis amigas que me apoyaron en todo momento y me incentivaron a avanzar. A Leti por la ayuda en el análisis de datos.

Al Conacyt por el apoyo financiero para la realización de la maestría.

A todos aquellos que de una manera u otra me apoyaron y que han hecho posible el desarrollo de este trabajo.

Índice

Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas	v
Lista de abreviaturas	vi
Título.....	1
Resumen.....	2
Abstract	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Dengue, la enfermedad. Generalidades.....	5
1.1.1 Reseña histórica	5
1.1.2 Manifestaciones clínicas	6
1.1.3 Fisiopatología e Inmunidad.....	7
1.2 Agente etiológico. Virus del dengue	8
1.2.1 Características estructurales.....	8
1.2.2 Replicación viral	10
1.2.3 Ciclo de transmisión. Vectores	11
1.2.4 Tipos y genotipos	12
1.3 Diagnóstico.....	15
1.4 Prevención y control.....	18
1.5 Epidemiología del dengue	19
1.5.1 Dengue en las Américas	19
1.5.2 Dengue en Paraguay	21
1.6 Justificación.....	24
2. OBJETIVOS	26

2.1.	Objetivo General	27
2.2.	Objetivos Específicos	27
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1	Diseño, local y población del estudio.....	29
3.1.1	Diseño y local del estudio.....	29
3.1.2	Población de estudio y colecta de muestras.....	29
3.2	Cepas virales	30
3.3	Extracción de ARN viral	31
3.4	Detección del genoma viral mediante RT-PCR en tiempo real	31
3.5	Aislamiento viral en cultivo celular	32
3.6	Caracterización molecular.....	33
3.6.1	Transcripción Reversa (RT).....	33
3.6.2	Tipificación	34
✓	<i>Tipificación por amplificación de una región parcial del gen de la proteína NS5</i>	34
✓	<i>Tipificación por amplificación del gen de la proteína E</i>	35
3.6.3	Secuenciación del gen de la proteína E.....	36
3.6.4	Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas	38
4.	RESULTADOS	40
4.1	Características clínicas y demográficas de los pacientes	41
4.2	Detección del genoma viral en el suero de pacientes.....	43
	Aislamiento en cultivo celular.....	44
4.3	Caracterización molecular.....	45
4.3.1	Identificación de tipos de DENV.....	45
4.3.2	Secuenciación del gen de la proteína E	52

4.3.3 Análisis filogenético de DENV basados en la secuencia del gen de la proteína E	54
5. DISCUSIÓN	66
Análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E	71
6. CONCLUSIONES	77
7. PERSPECTIVAS	79
8. BIBLIOGRAFÍA	82
9. ANEXOS	98

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del genoma del DENV	9
Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo del DENV	11
Figura 3. <i>Aedes aegypti</i> , principal vector de transmisión del DENV	12
Figura 4. Curva estándar para cuantificación de la carga viral	44
Figura 5. Efecto citopático observado en células C6/36.....	44
Figura 6. Resultados de la tipificación mediante amplificación del gen de la proteína NS5	45
Figura 7. Resultados de la tipificación mediante amplificación del gen de la proteína E	46
Figura 8. Mapa de distribución de los aislados de DENV-1 y DENV-2	51
Figura 9. Electroferograma obtenido del análisis de los fragmentos purificados.....	52
Figura 10. Representación del gel virtual obtenido del análisis de los fragmentos purificados ...	53
Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de aislados de DENV-1 mediante el método de Neighbor-Joining.....	55
Figura 12. Representación ampliada del genotipo V obtenida del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 mediante el método de Neighbor-Joining	57
Figura 13. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de aislados de DENV-2 mediante el método de Neighbor-Joining.....	61
Figura 14. Representación ampliada del genotipo Americano/Asiático obtenida del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de aislados de DENV-2 mediante el método de Neighbor-Joining.....	63

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de los pacientes según edad	41
Tabla 2. Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes	42
Tabla 3. Distribución geográfica de los pacientes según procedencia.....	43
Tabla 4. Resultados de la RT-PCR en tiempo real, aislamiento y tipo viral	47
Tabla 5. Distribución geográfica de los aislados tipificados	50
Tabla 6. Divergencia nucleotídica y aminoacídica entre cepas de DENV-1 aisladas en Paraguay y otras recuperadas del GenBank basados en la secuencia del gen de la proteína E.....	59
Tabla 7. Divergencia nucleotídica y aminoacídica entre cepas de DENV-2 aisladas en Paraguay y otras recuperadas del GenBank basados en la secuencia del gen de la proteína E.....	65

Lista de abreviaturas

ADE	del inglés <i>Antibody-dependent enhancement</i>
ADNc	Ácido desoxi-ribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
col.	Colaboradores
DENV	Virus del dengue
dNTP	Desoxi-ribonucleótidos trifosfato
Dpto	Departamento (división política)
EUA	Estados Unidos de América
FD	Fiebre del dengue
FHD	Fiebre hemorrágica del dengue
hLRT	del inglés <i>hierarchical likelihood ratio test</i>
L-15	Medio de cultivo Leibovitz
M	Molar
μL	Microlitros
mM	Milimolar
NJ	del inglés <i>Neighbor-joining</i>
NS1	Proteína no estructural 1
NS5	Proteína no estructural 5
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	del inglés <i>Polimerase chain reaction</i>
Rca.	República
RE	Retículo endoplasmático
RT-PCR	del inglés <i>Reverse transcriptase polimerase chain reaction</i>
SCD	Síndrome de choque por dengue
SFB	Suero fetal bovino
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TR	Test rápido
U/μL	Unidades por microlitro
UPF	Unidades formadoras de placas
UTRs	del inglés <i>Untranslated regions</i>
V	Voltios
vs.	Versus

*“Epidemiología molecular del virus del dengue aislado de pacientes del Hospital Central del
Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011”*

*"Molecular epidemiology of dengue virus isolated from patients of the Hospital Central del
Instituto de Previsión Social between February and June 2011"*

Resumen

La enfermedad causada por el virus del dengue, *Dengue virus* (DENV), es una de las enfermedades virales reemergentes de mayor importancia a nivel mundial y en Paraguay constituye un problema de salud pública. Se estudió la epidemiología molecular del DENV aislado de pacientes del Hospital Central del Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011. El DENV aislado se tipificó por amplificación de los genes que codifican la proteína NS5 y de la envoltura (E). Se secuenció el gen de la proteína E, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de aislados de diferentes países. Se aisló DENV a partir de 78/98 sueros de pacientes con resultados positivos para NS1, de los cuales 60 correspondían a DENV-1 y 18 a DENV-2. Se secuenció el gen de la proteína E de 45 DENV-1 y 11 DENV-2, estos pertenecían al genotipo V y al genotipo Americano/Asiático respectivamente. Se mostró una relación filogenética de los virus aislados con virus provenientes del Caribe y se sugirió que la introducción de ambos tipos pudo haber sido a través de Brasil. Se observó que los DENV-1 y DENV-2 aislados en 2011 pertenecían a grupos distintos de los detectados en años anteriores, sugiriendo la ocurrencia de un reemplazo de grupos. No obstante, se precisan más estudios para demostrar la asociación entre la introducción de nuevos grupos y el aumento de casos y muertes registrados en 2011 en Paraguay. Este estudio refuerza la relevancia de una vigilancia continua de los virus circulantes en el país.

Palabras claves: dengue, epidemiología molecular, proteína de la envoltura, diversidad genética

Abstract

The disease caused by the *Dengue virus* (DENV), is one of the most important viral re-emergent diseases worldwide and has a major impact on public health in Paraguay. We studied the molecular epidemiology of DENV isolated from patients of the “Hospital Central del Instituto de Previsión Social” between February and June in 2011. The isolated DENV was typified by amplifying the genes encoding the NS5 and envelope (E) proteins. The entire envelope gene was sequenced and the obtained sequences were compared to those from different countries. DENV was isolated from 78/98 sera from patients with positive results for NS1, of which 60 were DENV-1 and 18 were DENV-2. The envelope gene of 45 DENV-1 and 11 DENV-2 were sequenced, they belonged to genotype V and American/Asian genotype respectively. It was shown a phylogenetic relationship with virus isolated from the Caribbean and it was suggested that introduction of both types may have been through Brazil. It was observed that DENV-1 and DENV-2 isolates in 2011 belonged to other groups than those detected in the country in previous years, suggesting the occurrence of a group replacement. However, further studies are needed to demonstrate the association between the introduction of new groups in the raise of number of cases and deaths registered in 2011 in Paraguay. This study strengthens the need for continuous surveillance of circulating virus in the country.

Keywords: dengue, molecular epidemiology, envelope protein, genetic diversity

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dengue, la enfermedad. Generalidades

El dengue es una enfermedad infecciosa no contagiosa causada por el virus del dengue (DENV), el cual consta de 4 tipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y es transmitida principalmente por mosquitos vectores del género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*). Es considerada la patología viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en términos de morbilidad y mortalidad humana, encontrándose entre las patologías infecciosas emergentes y re-emergentes de mayor impacto a nivel global (1, 2).

Esta enfermedad afecta a más de cien países, principalmente a aquellos localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), dos billones y medio de personas viven en áreas de riesgo de contraer esta enfermedad. Anualmente se reportan entre cincuenta a cien millones de individuos infectados, de los cuales aproximadamente quinientos mil requieren hospitalizaciones, registrándose una tasa de mortalidad anual del 1 al 5 % (3, 4).

1.1.1 Reseña histórica

El término “dengue” se originó en América entre 1827 y 1828, a raíz de una epidemia en el Caribe que causaba fiebre, artralgias y exantema. Los esclavos provenientes de África identificaron a esta entidad patológica como *dinga* o *dyenga*, homónimo del Swahili *Ki denga pepo*, que significa ataque repentino (calambre o estremecimiento) provocado por un “espíritu maligno” (5).

La enfermedad del dengue fue descripta clínicamente por Benjamin Rush en Filadelfia, Pensilvania, EUA, en 1780 (6). Se trata de una patología antigua que se distribuyó mundialmente en los trópicos alrededor de los siglos XVIII y XIX a causa de la expansión de la industria y el

comercio marítimo. La epidemiología a nivel global y la dinámica de transmisión del virus del dengue cambiaron drásticamente en el sudeste asiático durante la Segunda Guerra Mundial; dicha zona geográfica fue identificada como fuente para la rápida y dramática re-emergencia del dengue a nivel mundial, inicialmente facilitada por el movimiento de buques (7).

1.1.2 Manifestaciones clínicas

La enfermedad puede darse de forma asintomática o presentarse con una amplia variedad de signos y síntomas. La información clínica de los brotes ocurridos a finales de 1960 en el sudeste asiático fue la base para la clasificación clínica del dengue, la misma fue publicada en las guías de la OMS en 1975 y actualizada en 1997 (8, 9). De acuerdo con la antigua clasificación de la OMS, las infecciones sintomáticas causadas por el virus del dengue se agruparon en tres categorías: *fiebre indiferenciada*, *fiebre por dengue (FD)* y *fiebre hemorrágica por dengue (FHD)*. Además, la FHD, se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, donde los grados III y IV corresponden al *síndrome de choque por dengue (SCD)*. Los grupos expertos de consenso en América Latina (Habana, Cuba, 2007), Asia Suroriental (Kuala Lumpur, Malasia, 2007) y en las oficinas principales de la OMS en Ginebra, Suiza en 2008 acordaron que: “*el dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes y a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles*”. Debido a esto, se llegó a un consenso en cuanto a la clasificación del dengue de acuerdo a su gravedad y fue publicada en una nueva guía de la OMS en 2009 (10). Utilizando una serie de parámetros clínicos, de laboratorio o ambos, se puede observar unas diferencias entre el *dengue grave* y el *dengue*, dividiéndose éste último en dos subgrupos: *dengue con signos de alarma* y *dengue sin signos de alarma* (11).

En el cuadro febril, relativamente autolimitado, pueden presentarse fiebre, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, artralgia y mialgia, además, anorexia, náuseas, vómitos y otros pueden acompañar el cuadro clínico (8).

El dengue puede progresar a dengue grave caracterizado por fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia, a menudo alteraciones circulatorias y choque, además puede observarse trombocitopenia moderada o marcada con simultánea hemoconcentración, hematocrito aumentado, aumento de la permeabilidad vascular, etc. Los principales cambios fisiopatológicos que determinan la gravedad del dengue hemorrágico son la hemostasia anormal y la extravasación de plasma de forma selectiva en las cavidades pleural y abdominal (12).

La extravasación de plasma puede resultar en una disminución del volumen plasmático que compromete el sistema circulatorio llevando al choque hipovolémico y en algunos casos a la muerte. Cuando se producen las hemorragias, éstas se asocian a un choque profundo debido a la combinación de trombocitopenia, hipoxia y otros factores que llevan al fallo de múltiples órganos y a la coagulación intravascular diseminada (13).

1.1.3 Fisiopatología e Inmunidad

Los mecanismos moleculares que subyacen a la enfermedad y los factores exactos que contribuyen al progreso de la enfermedad aun no son muy claros. Entre los parámetros conocidos involucrados se encuentran factores asociados al huésped, tales como edad, sexo, estado nutricional y la genética. Además, infecciones anteriores por DENV y la presencia de anticuerpos maternos interfieren y afectan el curso de la infección por DENV (14). Datos epidemiológicos indican que factores virales también deben influir en el desarrollo de la enfermedad y que la virulencia difiere entre las cepas de DENV, incluyendo cepas dentro del mismo tipo viral (15, 16).

La infección con uno de los tipos de dengue produce inmunidad permanente contra ese tipo en particular, pero se origina solo una protección a corto plazo contra los demás tipos (12).

Los casos de dengue grave se presentan en una pequeña proporción de pacientes, observándose la mayoría de los casos en pacientes con infección secundaria, aunque también puede ocurrir en pacientes experimentando infección por el virus del dengue por primera vez (17). En 1970, Halstead y colaboradores (y col.) propusieron la teoría de que los individuos que cursan con una infección secundaria debida a un tipo viral distinto al de la primera infección, desarrollan una respuesta exacerbada dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent enhancement* ADE), lo cual conduce a presentar las formas más graves de la enfermedad. Esto se debe a que anticuerpos no neutralizantes pre-existentes opsonizan el virus y favorecen su entrada a monocitos/macrófagos, con la posterior inducción de la liberación de mediadores vasoactivos resultando en el aumento de la permeabilidad vascular característica del dengue grave (18, 19). Además, ciertos productos virales tales como la proteína no estructural 1 (NS1) puede también jugar un importante papel en el desarrollo de las formas graves de la enfermedad a través de la regulación de la activación del sistema complemento y la permeabilidad vascular (20, 21).

1.2 Agente etiológico. Virus del dengue

1.2.1 Características estructurales

El virus del dengue (DENV) corresponde a un arbovirus («arbo» acrónimo del inglés *arthropod-borne*, transmitido por artrópodos), pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. La partícula viral del DENV está constituida por una membrana lipoprotéica y por una nucleocápside de simetría icosaédrica. Posee un genoma viral de ARN (*Ácido Ribonucleico*) de cadena simple y de polaridad positiva, con un tamaño molecular de aproximadamente 10,7 kilobases (kb). Este ARN, que funciona como mensajero, presenta un único marco de lectura

abierto (*ORF, Open Reading Frame*), flanqueado por dos regiones no codificantes denominadas 5' y 3' *UTRs* (del inglés *Untranslated regions*) de aproximadamente 95-135 y 114-650 nucleótidos respectivamente, las cuales poseen estructuras secundarias características que son necesarias para una eficiente traducción y replicación. El ORF codifica para una única poliproteína precursora la cual es procesada por proteasas virales y del huésped en tres proteínas estructurales (“C” de la nucleocápside, “prM/M” premembrana/membrana y “E” de la envoltura) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Figura 1) (22, 23).

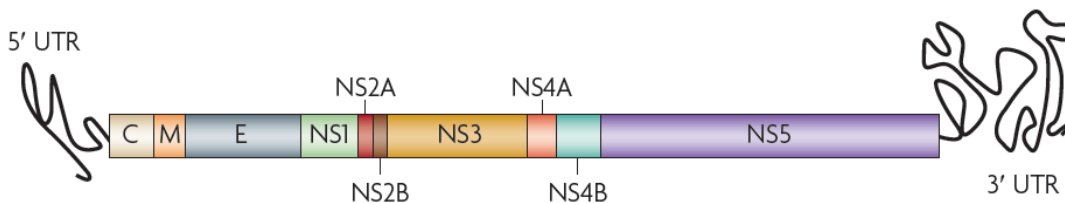


Figura 1. Esquema del genoma del DENV

El único marco de lectura abierto se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes (5' y 3' *UTRs*), codifica para tres proteínas estructurales: Cápside (C), membrana (M) y envoltura (E); y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Fuente: Guzmán y col., 2010 (24).

Estudios de similitud de secuencias revelaron que las proteínas NS5 son las de mayor conservación entre las proteínas no estructurales de los flavivirus (25). Por ello varios trabajos han seleccionado a esta proteína como blanco de amplificación tanto para detección del género flavivirus como para la identificación de especies específicas y tipos en el caso del DENV (26-30). Además, se han realizado estudios filogenéticos basados en las secuencias del gen que codifica para dicha proteína (31-34).

La glicoproteína E de DENV corresponde al mayor componente de la superficie viral y se compone de 3 dominios (Dominios I, II, y III), de conservación estructural significativa

comparando con otros flavivirus. Se ha sugerido que el dominio III de la proteína E, que adopta un plegamiento tipo inmunoglobulina, contiene sitios de reconocimiento de los receptores celulares de superficie (35, 36), por lo que esta proteína se encuentra involucrada en mecanismos de tropismo celular y su participación es determinante en el mecanismo de entrada del virus a la célula mediante interacciones con receptores celulares (37) .

1.2.2 Replicación viral

Las partículas virales ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptor. Específicamente, la unión se produce cuando la glicoproteína E de la envoltura viral se une a un receptor en la superficie celular. Esta interacción induce a la internalización por endocitosis. Posteriormente el endosoma que contiene la partícula viral se funde con el lisosoma y esto ocasiona a una disminución del pH intraendosomal. La proteína E sufre un reordenamiento conformacional debido al pH reducido del endosoma, este cambio conformacional induce la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal de la célula huésped, liberando el ARN en el compartimiento citoplasmático (37, 38). Posteriormente comienza la traducción de la poliproteína y su procesamiento en la membrana del retículo endoplasmático (RE), la misma es procesada mediante proteasas virales y del huésped. El complejo replicativo viral es producido, ocurriendo la replicación y el empaquetamiento viral. El montaje de la partícula viral se produce dentro del lumen del RE, luego es transportada al complejo de Golgi donde nuevamente la partícula viral inmadura sufre modificaciones post traduccionales como glicosilaciones y procesamiento de la prM formando una partícula viral madura, la cual finalmente es liberada de la célula por exocitosis (Figura 2) (39, 40).

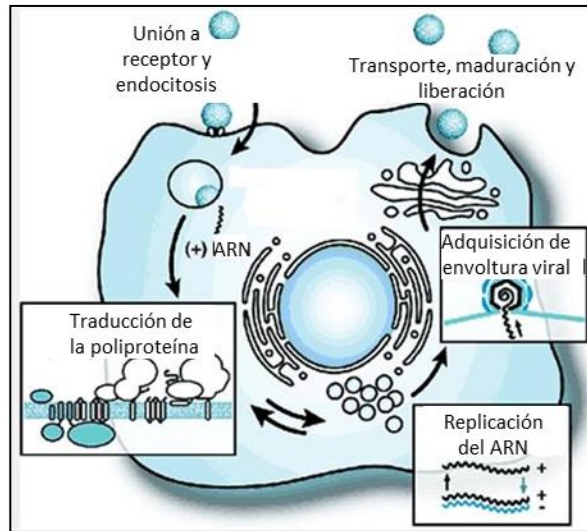


Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo del DENV

Esquema del ciclo de replicación viral del DENV. La partícula viral ingresa a la célula a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El genoma viral es liberado al citoplasma y se inician los procesos de replicación, montaje y maduración de nuevas partículas virales que luego serán liberadas de la célula mediante exocitosis. Fuente: Modificado de Lindenbach y col., 2007 (38).

1.2.3 Ciclo de transmisión. Vectores

Los cuatro tipos virales son mantenidos en dos ciclos de transmisión: selvático y humano. El ciclo selvático es ecológica y evolutivamente distinto del ciclo de transmisión humano. El mismo tiene lugar en los entornos selváticos del sudeste de Asia y África Occidental, en la península de Malasia y en el este de Senegal respectivamente. En este ciclo, la transmisión es mediada por artrópodos del género *Aedes* (*Ae.*) y los primates no humanos parecen actuar como únicos huéspedes amplificadores y reservorios. Así en África, los principales vectores incluyen *Ae. (Stegomyia) luteocephalus*, *Ae. (Diceromyia) furcifer*, y *Ae. (Diceromyia) taylori*. A pesar de que solo han sido reconocidos dos focos de transmisión selvática de DENV, si se considera la amplitud de la distribución geográfica tanto de vectores como reservorios primates, es probable que la transmisión selvática ocurra en otras zonas tropicales de África y Asia (41-43).

En la actualidad, casi todas las infecciones humanas se deben a cepas de DENV que circulan exclusivamente en ambientes domésticos y peridomésticos, donde el humano participa como único hospedador amplificador y reservorio. En este ciclo de transmisión humana, el mosquito *Ae. aegypti* actúa como vector principal del DENV, mientras que otras especies de *Aedes spp.*, como *Ae. albopictus* y *Ae. polynesiensis*, sirven como vectores secundarios (Figura 3) (7, 44).



Figura 3. *Aedes aegypti*, principal vector de transmisión del DENV

Fuente: Public Health Image Library. Disponible en: http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/9254/9254_lores.jpg

1.2.4 Tipos y genotipos

El virus consta de cuatro *tipos* antigénicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, que a pesar de que son casi idénticos epidemiológicamente, son genéticamente muy distintos. Por otra parte, estudios filogenéticos de cepas humanas de DENV han demostrado que cada tipo se organiza en grupos (*clusters*) los cuales fueron denominados como *genotipos* (5, 33, 45, 46).

A nivel mundial, existe una importante diversidad entre las cepas de DENV, incluyendo los cuatro tipos diferentes, los cuales difieren en un 25 a 40% a nivel de aminoácidos. (35, 47).

Estudios filogenéticos de **DENV-1** basados en secuencias del gen de la proteína E, así como también secuencias genómicas completas, han reconocido *cinco genotipos* distintos para

DENV-1, agrupados como se detalla a continuación: *a) genotipo I*: representado por cepas procedentes de todo el Sudeste asiático, China y Oriente Medio (Arabia Saudí). *b) genotipo II*: incluye algunas cepas de Tailandia. *c) genotipo III*: en el que están incluidos cepas selváticas aisladas en Malasia, sin embargo, la naturaleza selvática de dichos aislados ha sido cuestionada (42, 43). *d) genotipo IV*: en el que se agrupan cepas de Japón, Corea, China, Myanmar, Malasia e Indonesia, Islas del Pacífico Este (Polinesia Francesa, Nauru, Filipinas y Hawai) y de Australia. *e) genotipo V*: representado por cepas colectadas en las Américas, este de África y Asia (46, 48-54).

Si bien estudios filogenéticos anteriores basados en secuencias parciales (prM/E) o secuencias completas del gen de la proteína E de **DENV-2** habían identificado cuatro genotipos, estudios posteriores describieron *seis genotipos* para este tipo de DENV (42, 46, 55-58). Los mismos incluyen: *a) genotipo asiático I*: en el que se encuentran agrupadas cepas provenientes de Tailandia, Malasia, Camboya, Myanmar, Vietnam y Australia. *b) genotipo asiático II*: representado por cepas de China, Indonesia, Filipinas, Taiwán, Sri Lanka, India, Honduras y México. *c) genotipo del Sudeste asiático y América*: incluye cepas del Sudeste asiático y del Centro y Sur de América y el Caribe colectadas en los últimos treinta años. *d) genotipo cosmopolita*: el cual incluye cepas distribuidas en una amplia área geográfica, incluyendo el Este y Oeste de África, Oriente Medio, India, Islas del Pacífico y Australia *e) genotipo Americano*: el cual incluye cepas de Centro y Sur de América, el Caribe y cepas más antiguas aisladas en el subcontinente indio y las islas del Pacífico. *f) genotipo selvático*, incluyendo cepas humanas, de mosquitos y primates no humanos colectados recientemente en el Oeste de África y el Sudeste asiático (41, 59-61).

En 1994 *Lanciotti* y col. describieron por primera vez los **cuatro genotipos** de **DENV-3** basados en la secuencia de los genes de las proteínas prM/M y E. Fueron agrupadas cepas representativas de diferentes regiones de la siguiente manera: *(a) genotipo I*, Sudeste asiático, Filipinas y las Islas del Pacífico Sur; *(b) genotipo II*, Sudeste asiático continental; *(c) genotipo III*, representado por cepas que se propagan a través de Asia, África del Este y en las Américas y *(d) genotipo IV*, Puerto Rico y Tahití . Varios estudios filogenéticos posteriores basados en el secuenciamiento de todo el gen de la proteína E han confirmado estos genotipos (62-68). Así también estudios del genoma completo han demostrado la misma distribución de genotipos (69-71).

Análisis filogenéticos realizados por diversos grupos de investigadores basados en las secuencias genómicas completas como secuencias del gen de la proteína E han descrito un quinto genotipo para DENV-3 cuya clasificación precisa ha sido controversial (42, 72, 73).

Por último, han sido identificados **cuatro genotipos** para **DENV-4** (74-76). El estudio reciente realizado por Chen y col. basado en secuencias de la proteína E, han confirmado la existencia de los cuatro genotipos agrupándose de la siguiente manera: *a) genotipo I*: incluye cepas de Filipinas, Tailandia, Vietnam, Myanmar, Malasia, Sri Lanka, India, Japón, China y cepas aisladas en Brasil (77, 78). Este genotipo incluye el prototipo de DENV-4 (H241) aislado en Filipinas en 1956. *b) genotipo II*: agrupa a cepas de todo el sudeste asiático (Indonesia, Malasia, Singapur), China, las islas del Oeste del Océano Pacífico, Australia, el Caribe y las Américas. *c) genotipo III*: representado por cepas de Tailandia aisladas entre 1997 y 2001. *d) genotipo IV*: el cual incluye las tres cepas aisladas de monos centinelas en Malasia durante la década de 1970, estas cepas son genéticamente distintas a las cepas mencionadas anteriormente y se lo describe como el genotipo ancestral (43, 79).

Estudios basados en la diversidad genética del DENV han sugerido la existencia de “grupos” “clados” o “linajes” dentro de cada genotipo, con diferentes relaciones geográficas y temporales (62, 80-83). La identificación de los mismos puede llevar a un mejor conocimiento de los patrones de migración, así como la detección de virus emergentes con alteraciones en cuanto a virulencia, antigenicidad, etc (62).

Una observación cada vez más común en los estudios filogenéticos de DENV es el cambio o reemplazo de linajes. Esto puede ocurrir debido a que ciertos linajes de virus aislados en un determinado momento no generan linajes descendientes debido a que poseen mutaciones deletéreas por lo que son eliminados y/o a causa de que no se aíslan en los años posteriores debido a “cuellos de botella” en el tamaño de la población de virus. De otro modo más dramático, este fenómeno puede producirse cuando un clado o linaje que ha persistido en un lugar por años luego experimenta la extinción y a veces es reemplazado por un nuevo clado (47, 72, 75, 84).

Se ha reportado que el reemplazo o introducción de un nuevo tipo, genotipo o linaje de DENV está generalmente relacionado a un aumento en la incidencia de la enfermedad y frecuentemente por la aparición de brotes sustanciales (85, 86)

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico clínico del dengue resulta muy difícil pues la infección por el DENV puede presentarse con un amplio espectro clínico y sin signos ni síntomas específicos, así el diagnóstico de la enfermedad se basa en pruebas laboratoriales. Después de la aparición de los signos y síntomas, el virus se puede detectar durante cuatro a cinco días en: suero, plasma, células sanguíneas circulantes y otros tejidos. El aislamiento del virus, la identificación por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos y la detección del genoma

viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa previa retrotranscripción (RT-PCR) convencional o en tiempo real confirman la infección (87, 88).

El enfoque a nivel global del diagnóstico del dengue se basa principalmente en la detección de anticuerpos del tipo IgM anti-DENV y de antígeno viral NS1; en laboratorios más especializados el mismo se ve reforzado mediante la detección del ARN viral a través de RT-PCR y en raras ocasiones del aislamiento del virus. Por lo general la técnica de detección de IgM es robusta pero presenta ciertas limitaciones, escasa sensibilidad en los primeros días de enfermedad, reactividad serológica cruzada con otros flavivirus en algunas regiones y en infecciones secundarias pueden producirse niveles bajos hasta indetectables de anticuerpos del tipo IgM (87, 89, 90).

Entre las técnicas utilizadas para el diagnóstico se encuentran:

A. Técnicas para la detección viral:

a) Aislamiento viral: El principal método utilizado para el aislamiento del DENV es la inoculación de la muestra sospechosa en células en cultivo, así también puede realizarse en mosquitos o ratones recién nacidos. La línea celular que a menudo se utiliza para el aislamiento en cultivo celular corresponde a la *C6/36* que consiste en células de mosquito *Aedes albopictus*; (91). Luego de cinco a siete días de incubación de la muestra por lo general es posible observar un efecto citopático en las células (92, 93).

b) Detección de antígenos virales (NS1): Las células infectadas por el DENV, secretan la glicoproteína viral NS1 de 55 kDa, la misma ha sido detectada en suero de pacientes concomitante con la viremia y coincidente con la etapa febril de la enfermedad, desde el primer día de fiebre disminuyendo luego de 6 a 7 días. Alcon y col. lograron detectar la proteína incluso cuando la RT-PCR convencional fue negativa o en la presencia de anticuerpos del tipo IgM (94-

96). Varios estudios comparativos que evaluaron tanto ELISAs como test rápidos han obtenido rangos de sensibilidad del 60 – 87% y de especificidad de 97 – 100%. En un estudio multicéntrico realizado en seis países en el 2010 en el cual se ensayaron dos métodos de ELISA para detectar NS1, concluyeron que combinando la detección de IgM y NS1 se aumentaba la sensibilidad del diagnóstico de dengue (89).

c) Detección del material genético viral (RT-PCR): Desde hace varios años, se vienen desarrollando innumerables métodos de RT-PCR convencional para detectar el genoma viral (97-99), permitiendo algunos de ellos la identificación de los tipos del DENV (100-102).

Se han desarrollado ensayos de RT-PCR en tiempo real cuyas ventajas principales son la alta sensibilidad, la reducción del tiempo necesario para el análisis, bajo riesgo de contaminación con productos amplificados, y que permite la cuantificación de la carga viral (103). Varios utilizan sondas marcadas específicas como las TaqMan[®] (30, 104-106). El alto costo que implican las sondas fluorogénicas puede ser paliado con la sustitución de las mismas por agentes intercalantes del ADN como el SYBR[®] Green. En un estudio de costo-efectividad para la detección y tipificación del DENV, demostraron que el uso del SYBR[®] Green redujo a la mitad los costos materiales de diagnóstico en comparación con los ensayos que utilizaban sondas (107). Dos Santos y col. desarrollaron un método de RT-PCR en tiempo real que detecta los cuatro tipos del DENV en un solo paso, utilizando SYBR[®] Green. En este estudio fue demostrado que el mismo resultó ser mil veces más sensible que la RT-PCR convencional (108). En otro estudio realizado en el 2011, Paudel y col. describieron que la sensibilidad y especificidad de un ensayo con SYBR[®] Green eran bastante similares a aquellos que utilizaban sondas, además señalaron que el mismo fue igual de sensible en infección primaria o secundaria (109).

B. Técnicas serológicas

Entre las pruebas serológicas, se encuentra por un lado el ensayo de inhibición de la hemaglutinación y por otro, los métodos de ELISA de detección de anticuerpos de los tipos IgM e IgG que son los más utilizados y son considerados como requisitos mínimos para la confirmación de casos (87, 110).

Para el diagnóstico serológico definitivo son necesarias muestras de sangre pareadas colectadas entre los días cero y cuatro por un lado, y de los diez a veintiún días de la enfermedad por otro, a modo de que sea posible confirmar la seroconversión de anticuerpos del tipo IgM. (111). Un aumento de cuatro veces en el título de IgG es también consistente con una infección reciente (112, 113).

1.4 Prevención y control

Actualmente no existe una droga antiviral disponible contra el virus, ni se cuenta con un tratamiento específico para la enfermedad, lamentablemente, a pesar de los esfuerzos realizados, tampoco se dispone de una vacuna segura y eficaz para prevenirla. Entre los factores que influyen en la complejidad de la producción de la vacuna se incluye: la necesidad de desarrollar una vacuna contra los cuatro tipos para evitar el fenómeno de *ADE*, la poca comprensión de los mecanismos de la inmunidad protectora contra el virus, la falta de un modelo animal para la evaluación de las vacunas, entre otros; sin embargo se han observado avances significativos en los últimos años (114, 115).

En 2010, el desarrollo de la vacuna del dengue ha alcanzado un avance muy importante con el inicio de la fase III del ensayo clínico para investigar una vacuna tetravalente *CYD TDV* (*CYD Tetravalent Dengue Vaccine de Sanofi Pasteur*) la cual está compuesta de cuatro vacunas recombinantes vivas atenuadas (CYD 1-4) sobre una base de la organización genómica de la cepa de la vacuna 17D del virus de la fiebre amarilla (*Yellow fever virus*), donde a través de

manipulaciones en el genoma fueron sustituidos los genes prM y E por el de cada una de los genes de las proteínas prM y E de cada uno de los cuatro tipos del DENV. En el 2011 se informó que fue administrada a más de seis mil niños y adultos de 15 países endémicos y no endémicos de dengue y que no se habían presentado preocupaciones sobre su seguridad. Para fines del 2012 se esperan resultados preliminares de la eficacia y seguridad a gran escala de un estudio realizado en alrededor de cuatro mil niños tailandeses (116).

La vigilancia vectorial juega un papel decisivo en el control de epidemias del dengue, mediante la cual es posible identificar aumentos en la presencia del vector y los posibles criaderos, permitiendo una acción rápida para prevenir o disminuir la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, hasta hoy el principal problema es la sostenibilidad, se recomienda que la aplicación de estrategias de control integradas, incluyendo herramientas para reducir los índices larvarios y la cantidad de mosquitos adultos sea complementada con la participación intersectorial y de la comunidad (114, 117).

1.5 Epidemiología del dengue

1.5.1 Dengue en las Américas

En América, el DENV-1 fue detectado por primera vez en 1977 causando una epidemia que empezó en Jamaica, se expandió a Cuba, Puerto Rico y Venezuela, y eventualmente al resto de los países del Caribe, México, América Central y países del norte y sur de América (118-120). Desde entonces se ha mantenido principalmente en un patrón endémico asociado a formas clásicas de la enfermedad y esporádicamente asociado a casos graves de la misma (50).

Por otra parte, la primera evidencia de DENV-2 en las Américas se produjo en 1953 en Trinidad (121). Luego en 1981, en Cuba este tipo de DENV fue el causante de la primera gran

epidemia de dengue grave en las Américas donde fueron reportados 10.312 casos graves y 158 casos fatales (3, 122). Se postuló que un factor determinante en la aparición de casos graves en las Américas fue la importación a la región de genotipos distintos a los genotipos nativos. La rápida propagación de la enfermedad llevó a epidemias posteriores en Jamaica (1981-1982), Venezuela (1989-1990) y Brasil (1990), hasta extenderse en gran parte de Centro y Sudamérica (123-125).

El DENV-3 se asoció con las epidemias de 1962–1963 y 1968–1969 en varios países del Caribe y los últimos aislamientos realizados coincidieron con el momento de entrada del DENV-1 en la región en 1977 (126). Este tipo de DENV fue re-introducido en las Américas en 1994 causando epidemias en Nicaragua y Panamá, dispersándose luego a los países de América Central, México, países del Caribe y finalmente a Sudamérica (65, 127, 128).

En 1981, fue introducido el DENV-4 al continente americano, causando epidemias en países del Caribe, México, América Central y del Sur (119).

Actualmente los cuatro tipos de DENV circulan en América y desde 1963, la región ha experimentado brotes causados por al menos un genotipo de DENV-1, dos genotipos de DENV-2, tres genotipos de DENV-3 y un genotipo de DENV-4 (129). En los años noventa, los tipos circulantes más frecuentes en las Américas fueron DENV-1 y DENV-2. Este patrón cambió en el periodo 2000 a 2007 cuando DENV-2 y DENV-3 fueron reportados como tipos más frecuentes (118).

La incidencia global del dengue ha aumentado dramáticamente en los últimos años, hasta la semana epidemiológica (SE) 30 del año 2010, fueron reportados 1,082,402 de casos en la región de las Américas (130).

1.5.2 Dengue en Paraguay

En Paraguay se registraron dos grandes epidemias de dengue atribuidas al DENV-1, en los años 1988-1989 (aproximadamente 40.000 casos) y 1999-2000 (alrededor de 27.000 casos) (131, 132). En el 2001 se registró por primera vez la circulación del DENV-2 el cual co-circuló con el DENV-1, luego, en el 2002 se introdujo al país el DENV-3, registrándose alrededor de 1800 casos. En el mismo año se detectó la circulación simultánea de los DENV-1, DENV-2 y DENV-3. El DENV-3 fue nuevamente detectado en los siguientes dos años, luego en el 2005 circuló en el país el DENV-2 (133, 134).

En el 2006, 1700 casos se reportaron en una epidemia de dengue en Asunción atribuida al DENV-3, este tipo viral siguió circulando en el 2007, a comienzos de ese año se registraron los primeros casos graves con desenlace fatal. Este evento marcó un punto de inflexión en la historia del dengue en el Paraguay, ya que fue la primera vez que esta forma clínica grave fue observada en el país. En total, en el 2007 se reportaron 28.182 casos de dengue, 55 de dengue grave y 17 muertes. (134).

En la epidemia del 2008-2009 se detectaron DENV-1 y DENV-3 con predominancia de éste último. En el año 2010 volvieron a registrarse casos graves y muertes causadas por la infección por el virus, 30 y 15 casos respectivamente. En este año se reportó la circulación de DENV-1 y DENV-3 que ya habían sido detectados el año anterior, pero además fue detectado el DENV-2 que no había sido reportado en los últimos cinco años. Luego, en el 2011 se produjo la mayor epidemia en cuanto a la cantidad de casos y muertes registradas con respecto a años anteriores. En total fueron reportados 42.264 casos, de los cuales 97 fueron clasificados como dengue grave y se registraron 62 muertes. Se identificó la circulación de DENV-1 y DENV-2 en forma simultánea, con predominio de este último. Existe un claro aumento en el registro de casos

de dengue en nuestro país, así, la cantidad de casos confirmados en el año 2011 equivale a aproximadamente tres veces más de los registrados en el 2010 y cerca de diez veces más de los confirmados en el 2009 (135).

En marzo del 2012 se reportó la introducción del DENV-4 por primera vez al país, el mismo fue detectado solo en Asunción y el Departamento Central. El DENV-2 se mantuvo como tipo de DENV predominante. Las notificaciones de casos confirmados acumuladas del año 2012, hasta el 28 de junio, ascendieron a 24.924 y se registraron ya 55 muertes (136).

Mediante la comparación entre los años 2011 y 2012, la tasa de incidencia acumulada en el 2012 (hasta la SE 33) fue de 432 por 100.000 habitantes que con respecto al año 2011, es inferior en un 32% (137). Analizando la cantidad de casos y muertes en el mismo periodo en ambos años (hasta la SE 26) pudo observarse una mayor cantidad de casos registrados en 2011 (32.106) comparado con el 2012 (24.924), sin embargo es interesante resaltar que la tasa de letalidad de la enfermedad es mayor en el año 2012 (0,22%) con respecto al año anterior (0,17%) (136, 138). Existen ciertos estudios de caracterización molecular de aislados de DENV en Paraguay, Avilés y col. estudiaron cepas virales de DENV-1 correspondientes a la epidemia del año 2000 de Paraguay y Argentina (139). Por otro lado, Aquino y col. realizaron el análisis filogenético de los aislados de DENV-3 provenientes de Brasil y Paraguay (2002-2004), demostrando que los aislados pertenecían al genotipo III circulante en las Américas con un ancestro común probablemente originado en el Sudeste de Asia. Además sugirieron que este tipo de DENV había sido introducido al país al menos tres veces desde Brasil (66). También, Díaz Aquino y col. estudiaron la variabilidad genética de DENV-2 y DENV-3 aislados de epidemias ocurridas en el periodo 2001-2006 (140). Finalmente, el estudio más reciente de aislados de DENV de nuestro país fue publicado por Alfonso y col., el mismo describió la relación

filogenética de aislados de DENV-3 de Brasil y Paraguay teniendo en cuenta las secuencias completas del marco abierto de lectura (ORF). Los autores describieron la agrupación de las cepas en genotipos, linajes y sub-linajes. Además observaron que construyendo árboles filogenéticos con cualquiera de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas virales es posible identificar los genotipos de DENV-3 (80).

1.6 Justificación

En los últimos cuatro años, en Paraguay, han sido reportados más de 85.000 casos de dengue y alrededor de 130 muertes a causa de la enfermedad. En las epidemias ocurridas en el país se ha detectado DENV-1, DENV-2 y DENV-3; y desde el año 2012, el DENV-4 (135, 137). En 2011, Paraguay ha sufrido la mayor epidemia en comparación a años anteriores, durante la misma fue detectada la circulación de DENV-1 y DENV-2 (135).

Estudios filogenéticos de DENV aislados en Paraguay han demostrado la circulación de cepas pertenecientes a diferentes grupos dentro de los genotipos designados para los distintos tipos de DENV, así también se ha reportado la posible asociación entre la introducción de un nuevo grupo y el cambio de tipo viral predominante (139, 140)

En países endémicos para el dengue se ha demostrado que pueden ocurrir reemplazos de tipos de DENV o genotipos así como de grupos dentro de los genotipos (84, 141). Además, reportes previos han señalado la asociación entre los mencionados reemplazos y cambios en la incidencia y severidad de la enfermedad (15, 141, 142).

A pesar que la patogénesis de los casos graves es aún poco comprendida, estudios filogenéticos del DENV han sugerido la asociación entre los genotipos específicos y la severidad de la enfermedad (143). Así también, se ha descrito que aislados de diferentes epidemias, leves o graves, formaron grupos genéticamente distintos, sugiriendo un rol de la genética viral en el desarrollo de casos graves (15). Los estudios filogenéticos pueden constituir una herramienta importante para realizar el monitoreo de la introducción y dispersión de los virus, además de predecir las posibles consecuencias epidemiológicas potenciales de este tipo de eventos (83). Dichos estudios permiten determinar la variabilidad genética de los virus y establecer relaciones

filogenéticas entre virus aislados en diferentes regiones o de diferentes epidemias, estableciendo posibles patrones de migración y evolución de los virus (144).

Varios estudios han analizado diferentes regiones del genoma del virus así como del genoma completo del DENV a fin de determinar el origen, la evolución, además de examinar la diversidad viral (145). Debido a que se conoce que la proteína de la envoltura (E) del virus es el mayor determinante del tropismo, constituye el principal blanco de anticuerpos neutralizantes y es la responsable de mediar la unión y fusión del virus a las células huésped, encaminamos este estudio al análisis filogenético basado en la secuencia completa del gen que codifica para esta proteína (37, 146)

Por lo citado anteriormente, destacando el impacto del dengue para la salud pública del Paraguay y considerando que no existen muchos datos de variabilidad genética de DENV aislados en el país, en el presente estudio se estudió la epidemiología molecular del DENV aislado de pacientes del Hospital Central del Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011.

Los resultados obtenidos del estudio aportarán datos acerca de los tipos circulantes en una población de Paraguay en 2011, la variabilidad genética de las cepas virales aisladas y su relación filogenética con aislados a nivel mundial, incluyendo los virus aislados en el país en años anteriores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estudiar la epidemiología molecular del virus del dengue aislado de pacientes del Hospital Central del Instituto de Previsión Social entre febrero y junio del 2011.

2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar los tipos virales y determinar la distribución geográfica de los mismos.
2. Determinar la variabilidad genética mediante el análisis de secuencias nucleotídicas del gen de la proteína E de los virus aislados.
3. Analizar el relacionamiento filogenético y evolutivo de los virus aislados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño, local y población del estudio

3.1.1 Diseño y local del estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con muestreo no probabilístico a criterio. Las muestras fueron colectadas en el Servicio del “Laboratorio de urgencias, hormonas y marcadores tumorales” del Hospital Central del Instituto de Previsión Social (HC-IPS) durante el periodo entre febrero y junio del 2011.

El IPS, tiene a su cargo la administración del Seguro Social en Paraguay, cuenta con 93 servicios organizados en tres niveles de atención y 8 niveles de complejidad. El Hospital Central de IPS, se encuentra ubicado en el barrio Santo Domingo de Asunción, representa al nivel terciario especializado y brinda atención a pacientes de diferentes localidades, principalmente de Asunción además de otras ciudades del Departamento Central. El “Departamento de Análisis Clínicos” del HC-IPS ofrece cobertura integral en la realización de análisis laboratoriales y en la totalidad del año 2011 atendió a 551.916 pacientes, a su vez, una de las divisiones del mencionado departamento corresponde al “Servicio de Laboratorio de Urgencias, Hormonas y Marcadores Tumorales” que en el mismo año recibió a 137.561 pacientes (Datos obtenidos del Dpto. Epidemiología, HC-IPS).

3.1.2 Población de estudio y colecta de muestras

En este estudio fueron inicialmente incluidos 178 pacientes, de ambos sexos y de todas las edades, que acudieron al HC-IPS durante el periodo de febrero a junio del 2011 con sospecha clínica de infección aguda por DENV y que contaban con pedido médico para la realización del test rápido (TR) de detección de antígeno NS1 de dengue (hasta 5 días después del inicio de los síntomas).

En el momento de la toma de muestra de sangre para realizar el TR de NS1, una parte de la misma (2-3 mL), fue separada en un tubo estéril libre de ribonucleasas y desoxi-ribonucleasas (RNAsas-DNAsas), conservada a 4°C y luego transportada al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA). Posteriormente, se obtuvo el suero mediante centrifugación y se fraccionó en alícuotas que fueron conservadas a -70°C hasta su procesamiento. Luego de obtener los resultados del TR para NS1 (*Standard Diagnostics, Inc., Korea*) del Laboratorio de Urgencias del IPS, las muestras con resultados positivos, en total 98, fueron seleccionadas para realizar la caracterización molecular del virus del dengue. Según datos del fabricante la sensibilidad del TR para NS1 era del 92,8% y la especificidad del 98,4%.

Los datos de los pacientes fueron registrados en la ficha clínica-epidemiológica del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Paraguay (MSPyBS) (Anexo 1), los mismos fueron procesados en forma de códigos asegurando la confidencialidad y protegiendo la identidad de los pacientes. El protocolo de investigación del proyecto fue aprobado por los comités científico y ético del IICS-UNA. En base a los registros de las ciudades y/o barrios de los cuales provenían los pacientes se representó la ubicación geográfica en mapas mediante el programa *Google Earth 6.2.2.6613 (Google Inc., EUA)*.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Departamento de Producción-Bioquímica del IICS-UNA y en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto, Universidad de San Pablo, Brasil.

3.2 Cepas virales

Como controles, se utilizaron cepas virales de DENV cedidas por el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto (Universidad de San

Pablo, Brasil). Se incluyeron las siguientes cepas: DENV-1 cepa Mochizuki con título de 1×10^8 UFP/mL, DENV-2 cepa NGC con título de $5,75 \times 10^6$ UFP/mL y DENV-3 cepa BR/D3 SL3/2002 con título de 1×10^7 UFP/mL. Los stocks virales provenientes de sobrenadante de cultivo celular de células C6/36 con 20% de SFB fueron conservados a -70°C .

3.3 Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral fue realizada tanto a partir del suero de pacientes con resultado positivo del TR para NS1 como del sobrenadante de cultivo de células C6/36 luego del aislamiento viral para su confirmación por RT-PCR en tiempo real.

El ARN viral fue purificado a partir de 200 μL de suero o sobrenadante de cultivo celular utilizando el kit de extracción AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, EUA), respectivamente, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante, el ARN fue eluido con 60 μL de tampón de elución y fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

3.4 Detección del genoma viral mediante RT-PCR en tiempo real

La reacción de RT-PCR en tiempo real fue utilizada para detectar el genoma del DENV en suero de los pacientes con resultado positivo del TR para NS1 y en sobrenadante de cultivo celular a modo de confirmar el aislamiento del virus. La metodología empleada fue aquella descrita previamente por dos Santos y col. (108). Brevemente, se utilizó el kit de un solo paso denominado *SuperScript III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, EUA), oligonucleótidos (*primers*) que reconocen la región no codificante 5'UTR altamente conservada en los cuatro tipos de DENV, descritos anteriormente por Aquino y col. (66). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μL conteniendo: 12,5 μL del reactivo 2X *SYBR Green* [0,4 mM de cada dNTP, 6mM MgSO_4], 0,5 μL de las enzimas Retrotranscriptasa y ADN polimerasa:

SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix [2.5 U], 0,5 µL de *primers*: 5' UTR-S [10 µM] y 5'UTR-C [10 µM] y 11 µL de ARN purificado. La amplificación se realizó utilizando el sistema “*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*” (*Applied Biosystems, EUA*), en las siguientes condiciones: 50°C por 20 minutos, 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 40 segundos, y 72°C por 30 segundos. Finalmente, una curva de disociación fue construida incubando los productos amplificados de 60 a 95 °C con un aumento de 0,2 °C/segundo para determinar la especificidad de la reacción. La temperatura de disociación (Temperatura de *melting*, T_m) de los productos amplificados específicos correspondientes a los controles virales de los cuatro tipos de DENV se encontró en el rango de 78,9 – 80,8 °C, mientras que el valor de T_m para los dímeros de *primers* fue menor, encontrándose en el rango de 72,2 – 73,9°C.

Para la cuantificación viral relativa se construyó una curva estándar a partir de diluciones seriadas de una cepa control de DENV-2. Para ello se utilizó el RNA obtenido del sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas con la cepa control de DENV-2 NGC conteniendo $5,75 \times 10^6$ UFP/mL. La curva se obtuvo mediante el gráfico de los valores de Ct, del inglés “*threshold cycle*” en el eje de abscisas y el logaritmo de la concentración (UFP/mL) en el eje de ordenadas. El valor de Ct se define como la cantidad de ciclos de PCR requeridos para que se detecte fluorescencia correspondiente a una muestra con la suficiente intensidad para alcanzar un límite predeterminado denominado “*threshold*”. El valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración o cantidad de copias iniciales en la muestra.

3.5 Aislamiento viral en cultivo celular

El aislamiento viral se realizó mediante inoculación de los sueros de pacientes en cultivos de células C6/36 (91). Para ello fueron utilizados los sueros de pacientes en los cuales se detectó

el DENV mediante RT-PCR en tiempo real. Células C6/36 fueron cultivadas en medio Leibovitz (L-15) (*Sigma-Aldrich, Inc., E.U.A.*), preparado según recomendaciones del fabricante, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (*Sigma-Aldrich, Inc., E.U.A.*), con 1% de penicilina/estreptomicina y mantenidas en estufa a 28°C (*Quimis, Brasil*). Luego, la monocapa celular fue inoculada con 20µL de suero de pacientes e incubada a 28°C por una hora con agitación suave cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo se incubó con medio de mantenimiento L-15 suplementado con 2% de SFB a 28°C por 5 a 7 días. Después de dos pasajes sucesivos, se colectó el sobrenadante celular, se añadió SFB para una concentración final del 20%, conservando en alícuotas a -70°C hasta su procesamiento. Como control negativo, células sin infectar fueron incubadas en paralelo. El aislamiento viral fue verificado mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

3.6 Caracterización molecular

La caracterización molecular de los virus aislados fue realizada en Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto (Universidad de San Pablo USP, Brasil).

3.6.1 Transcripción Reversa (RT)

El ADN complementario viral (ADNc) a partir del ARN extraído de los virus aislados fue sintetizado como sigue: Se preparó una primera mezcla de reacción conteniendo 23 µL de ARN viral, 4 µL de *primers* aleatorios [50 ng/µL] (*random primers*) y 1 µL de la mezcla de los cuatro dNTPs (desoxi-ribonucleótidos trifosfato) [10 mM], fue incubada a 95°C por 1 minuto y rápidamente colocada en hielo por 5 minutos. Posteriormente, fue añadida una segunda mezcla

de reacción conteniendo: 2 μL de Transcriptasa reversa M-MLV [200 U/ μL] (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. Invitrogen, EUA*), 8 μL de tampón 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 1 μL de DTT [0,1 M] y 1 μL de inhibidor de ribonucleasas *RNaseOUT*[™] [40 U/ μL] (*Invitrogen, EUA*) dando un volumen total de 40 μL . Finalmente, se incubó en el termociclador (*BioRad My Cycler, EUA*) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas y a 85°C por 5 minutos. El producto se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

3.6.2 Identificación de los tipos virales

✓ *Tipificación por amplificación de una región parcial del gen de la proteína NS5*

Se amplificó una región parcial del gen de la proteína no estructural 5 (NS5) mediante una reacción de *PCR múltiplex* para los cuatro tipos de DENV en un solo paso. Esta reacción fue adaptada del protocolo descrito por Bronzoni y col. (28). Brevemente, se realizó una mezcla de reacción conteniendo 1 μL de cada *primer* [15/ μM], un *primer* “sentido” *FG1* común para todos los tipos de DENV y los cuatro *primers* “complementarios o reversos” específicos para los cuatro tipos (Anexo 2), 1 μL de dNTPs [10 mM], 2 μL de MgCl₂ [50 mM], 5 μL de tampón 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 0,3 μL de ADN polimerasa Platinum[®] *Taq* [5 U/ μL] (*Invitrogen, EUA*) y 32,7 μL de agua libre de ribonucleasas y desoxi-ribonucleasas. La mezcla de reacción fue añadida a 4 μL de ADNc obtenido por retrotranscripción en el paso anterior, totalizando un volumen final de 50 μL , la mezcla de reacción fue sometida a amplificación utilizando el termociclador (*BioRad, EUA*) bajo las siguientes condiciones: 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Finalmente, los productos amplificados fueron

sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,8% (*Invitrogen, EUA*) en tampón TAE 1X (0,04M Tris-acetato – 0,001M EDTA), llevada a cabo en cuba electroforética (*BioRad Subcell[®], EUA*) con fuente de poder (*BioRad Power Pac[®] EUA*) a voltaje constante 60V por 1.5 horas. La tinción se llevó a cabo con GelRed™ 10.000X (*Biotium Inc, EUA*) y la visualización mediante un trans-iluminador de luz UV. A fin de comparar el tamaño de los productos amplificados se incluyó en la corrida electroforética un marcador de tamaño molecular de 100 pb (*Axygen Scientific, Inc., EUA*). Los fragmentos generados para los tipos de DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, fueron de 472, 316, 659 y 222 pb, respectivamente. Los resultados obtenidos se registraron mediante fotodocumentador *MultiImage[®] Light Cabinet* y el programa *Alpha Imager (Alpha Innotech, EUA)*.

✓ *Tipificación por amplificación del gen de la proteína E*

Las muestras con resultados negativos mediante la reacción de tipificación por amplificación de la región parcial del gen de la proteína NS5 mencionada anteriormente, fueron tipificadas utilizando otra estrategia que consistió en la amplificación del gen de la proteína E. Se utilizaron *primers* tipo específicos en una sola reacción o en reacciones separadas para cada tipo de DENV debido a la proximidad de los tamaños de los fragmentos amplificados. Para DENV-1 se utilizaron *primers* descriptos por Christenbury y col. (147), para DENV-3 aquellos descriptos por Aquino y col. (66) y para DENV-2 se utilizaron *primers* diseñados en este estudio (Anexo 2). No se incluyeron *primers* para DENV-4 pues en Paraguay aún no había registros de la circulación de este tipo, además tampoco se lo había detectado mediante la reacción de tipificación por amplificación de la región parcial del gen de la proteína NS5 realizada previamente (135). La mezcla de la reacción consistió en 1 µL de dNTPs [10 mM], 1µL de cada *primer* [15 µM], 1,5 µL de MgCl₂ [50 mM], 5 µL de tampón 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4),

500 mM KCl], 0,3 µL de enzima ADN polimerasa Platinum® *Taq* [5 U/µL] (*Invitrogen, EUA*), 36,2 µL de agua libre de ribonucleasas y desoxi-ribonucleasas y 4 µL de ADNc, totalizando un volumen de 50 µL. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, posteriormente teñidos con GelRed™ 10.000X (*Biotium Inc, EUA*) y visualizados mediante un trans-iluminador de luz UV en las condiciones ya descritas. Los fragmentos generados para DENV-1, DENV-2 y DENV-3 fueron de 1855, 1680 y 1735 pb respectivamente.

3.6.3 Secuenciación del gen de la proteína E

✓ *Amplificación del gen de la proteína E de los virus aislados*

La reacción de amplificación del gen de la proteína E se realizó en las mismas condiciones descritas para la tipificación de los aislados en el presente trabajo con algunas modificaciones. La enzima utilizada fue la ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum® *Taq High Fidelity* 5 U/µL (*Invitrogen, EUA*), además MgSO₄ [50 mM] y tampón 10X para PCR de alta fidelidad [600 mM Tris-SO₄ (pH 8,9) 180 mM (NH₄)₂SO₄]. En las condiciones de termociclado se utilizó una temperatura de extensión a 68°C. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,8% para su posterior purificación con el reactivo comercial *AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit* (*Axygen Scientific, Inc., EUA*) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante con algunas modificaciones. El ADN fue eluido de la columna con 35 µL de agua libre de Ribonucleasas/Desoxi-ribonucleasas. Se realizó un análisis de los fragmentos seleccionados a fin de confirmar la purificación de los mismos y cuantificar la

concentración de ADN mediante el bioanalizador *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies, Inc., Alemania*). La técnica se basa en un ensayo de electroforesis en gel en formato de *chip* que consta de micro-canales los cuales son cargados con un polímero para el tamizaje molecular y agentes intercalantes fluorescentes para la detección de los fragmentos y estimación de la cantidad de ADN. El sistema provee información acerca del tamaño y cuantificación de ADN de los fragmentos en formato digital. En cada ensayo se incluye un marcador que contiene componentes de tamaños moleculares conocidos para la construcción de la curva estándar (tiempo de migración vs. tamaño) para luego calcular el tamaño de los fragmentos analizados en base al tiempo de migración. Además se añaden dos marcadores, de concentraciones conocidas, a modo de controles internos por cada muestra, uno de los cuales se utiliza para la cuantificación de ADN. La concentración de ADN en cada muestra se calcula mediante la comparación del área bajo el pico de señal de fluorescencia emitida por la muestra con la del control interno.

✓ *Secuenciación nucleotídica del gen de la proteína E de los virus aislados*

Los productos amplificados y purificados fueron sometidos a secuenciación utilizando los *primers* mencionados anteriormente para la amplificación del gen de la proteína E y además un *primer* correspondiente a la región interna del mismo gen descrito por Christenbury y col. (147). Se utilizó el kit *ABI PRISM[®] BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems, EUA*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El volumen total de reacción fue de 20 μL conteniendo 4 μL de *primer* [0,8 M], 3 μL de tampón de secuenciación *BigDye 5X* y 2 μL de la mezcla de reacción terminadora *BigDye* con los cuatro dideoxinucleótidos marcados. Se utilizaron volúmenes de productos de PCR purificados para alcanzar concentraciones suficientes para secuenciar, se completó a volumen final de 20 μL con

agua libre de ribonucleasas y desoxi-ribonucleasas. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 96°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos utilizando el termociclador (*BioRad, EUA*) y posteriormente se utilizó el secuenciador automático *ABI PRISM® 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems, EUA)*. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa Mega 5.0 (148) y la secuencia nucleotídica consenso de cada virus aislado fue determinada con el programa BioEdit v.7.0.9 (149).

3.6.4 Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas

✓ Base de datos de secuencias del GenBank

Para el análisis filogenético se creó una base de datos conteniendo información de las secuencias del gen de la proteína E correspondientes a aislados de diferentes países que fueron colectadas de la página de internet del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* que tiene disponible la base de datos del *GenBank*. La base de datos incluyó el código de acceso al *GenBank*, nombre de la cepa, país y año de aislamiento. Para cada cepa se creó una codificación compuesta por las iniciales del país de aislamiento seguido por el código de acceso y el año de aislamiento de la misma. Las secuencias fueron alineadas mediante el programa DAMBE 5.2.6 a fin de identificar las secuencias idénticas, las mismas fueron excluidas del análisis (150). También las secuencias depositadas como clones, mutantes y recombinantes fueron excluidas. Para el alineamiento final de las secuencias nucleotídicas se utilizaron 55 secuencias de DENV-1 y 61 de DENV-2 recuperadas del *GenBank*, además fue incluida una cepa de DENV-3 aislada en Tailandia en el 2001 (FJ744728) para ser utilizada como grupo externo a fin de enraizar los árboles filogenéticos (Anexos 3 y 4).

✓ *Análisis filogenético*

Las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína E (1485 pb) obtenidas en este estudio fueron alineadas, de acuerdo al tipo de DENV identificado, con secuencias nucleotídicas provenientes de distintos países colectadas del *GenBank*, para ello fueron utilizados los programas *CLUSTAL X 5.2* y/o el *CLC Sequence Viewer 6.6.5* (*CLCbio, Dinamarca*) (151). El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó utilizando el método de distancias o agrupamiento de vecinos, *Neighbor-joining* (NJ). Las secuencias fueron analizadas mediante el programa *jModeltest* para identificar el mejor modelo de sustitución nucleotídica, basado en el criterio del test de razón de probabilidad jerárquica (*hierarchical likelihood ratio test, hLRT*) (152). Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el programa *MEGA 5* (148) y soportados estadísticamente por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas. Las estimaciones de la divergencia evolutiva entre las cepas virales fueron calculadas utilizando el modelo de “*p-distance*” con 1000 réplicas mediante el programa *MEGA 5* (148), los valores fueron posteriormente convertidos a porcentajes.

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas y demográficas de los pacientes

Un total de 98 pacientes previamente diagnosticados para dengue mediante el TR de NS1 fueron incluidos en el estudio, de los cuales el 50% (49/98) correspondió a varones y el 50% (49/98) a mujeres. La media de la edad de los mismos fue de 27 ± 16 años, observándose un rango entre 2 y 78 años. Estratificando las edades en intervalos de 15 años, se observó que el 59% del total de pacientes tenía menos de 30 años (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los pacientes según edad

Intervalos de edades (años)	Frecuencia N=98	%
2 a 15	29	30
16 a 31	28	29
32 a 47	19	19
48 a 63	10	10
64 a 78	2	2
Sin datos	10	10
TOTAL	98	

Con respecto a las manifestaciones clínicas referidas por los pacientes, se registró una amplia variedad de signos y síntomas inespecíficos. Si bien ciertos signos y/o síntomas fueron más frecuentes, ninguno fue manifestado por la totalidad de los pacientes. Así, el 93,9% (92/98) de los pacientes refirió fiebre, ocupando el primer lugar como signo más frecuente en la población. Luego, con menos frecuencia que la fiebre, cantidades aproximadamente iguales de pacientes manifestaron dolores de cabeza y mialgias correspondiendo a 69,4% (68/98) y 68,4% (67/98) del total, respectivamente (Tabla 2).

No se registraron manifestaciones graves de la enfermedad puesto que las muestras fueron colectadas de pacientes ambulatorios que acudieron al Laboratorio de Urgencias y no fue

posible acompañar la evolución de los mismos ni incluir muestras de pacientes con cuadros clínicos graves.

Tabla 2. Manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes

Manifestaciones clínicas	Frecuencia (N=98)	(%)
Fiebre	92	93.9
Cefalea	68	69.4
Mialgias	67	68.4
Artralgias	52	53.1
Dolor retro-ocular	50	51.0
Náuseas	38	38.8
Dolor abdominal	22	22.4
Vómitos	15	15.3
Petequias	9	9.2
Exantema	6	6.1

En cuanto a la distribución geográfica de los pacientes según su procedencia, teniendo en cuenta la división política del Paraguay en 17 departamentos distribuidos en dos grandes regiones geográficas, oriental y occidental, se observó que los pacientes provinieron de 15 ciudades correspondientes a 3 departamentos del país. La mayoría de los pacientes provinieron del Departamento Central (Región Oriental), incluyendo ciudades del área metropolitana (Asunción, Mariano Roque Alonso, San Lorenzo, Luque, Ñemby, Capiatá, Limpio, Fernando de la Mora, Lambaré y Villa Elisa) y otras ciudades dentro del mencionado Dpto. (Areguá, Itá, Juan Augusto Saldívar). Así, el 37,8% (37/98) de los pacientes refirieron provenir de distintos barrios de Asunción y el 16,3% (16/98) de la ciudad de Mariano Roque Alonso (Tabla 3). Además, dos pacientes provinieron de departamentos que limitan con el Dpto. Central, un paciente de la ciudad de Emboscada, Dpto. de Cordillera y otro paciente de la ciudad de Villa Hayes, capital del Dpto. Presidente Hayes (Región Occidental).

Tabla 3. Distribución geográfica de los pacientes según procedencia

Ciudad	Frecuencia	
	N=98	%
Asunción	37	37.8
MRA	16	16.3
San Lorenzo	6	6.1
Luque	5	5.1
Ñemby	5	5.1
Capiatá	4	4.1
Limpio	4	4.1
Fndo. de la Mora	3	3.1
Areguá	2	2.0
Lambaré	2	2.0
Villa Elisa	2	2.0
Emboscada	1	1.0
Itá	1	1.0
J.A. Saldívar	1	1.0
Villa Hayes	1	1.0
Sin datos	8	8.2
TOTAL	98	

MRA: Mariano Roque Alonso; Fndo. de la Mora: Fernando de la Mora; J.A. Saldívar: Juan Augusto Saldívar

4.2 Detección del genoma viral en el suero de pacientes

Se obtuvieron resultados positivos mediante RT-PCR en tiempo real en 93/98 (95%) muestras de suero, el valor promedio de T_m fue de $78,8 \pm 0,7^\circ\text{C}$ con un rango comprendido entre $77,7$ y $80,8^\circ\text{C}$. El valor promedio de T_m para las muestras negativas fue de $72,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$, en un rango entre $72,2$ y $73,4^\circ\text{C}$, concordantes con los valores para los dímeros de *primers*.

La carga viral relativa detectada en las muestras de suero se encontró en el rango de 2 a 2×10^6 UFP/mL (Tabla 4) Esta carga viral relativa fue determinada a partir de la curva estándar construida con una cepa control de DENV-2 (Figura 4).

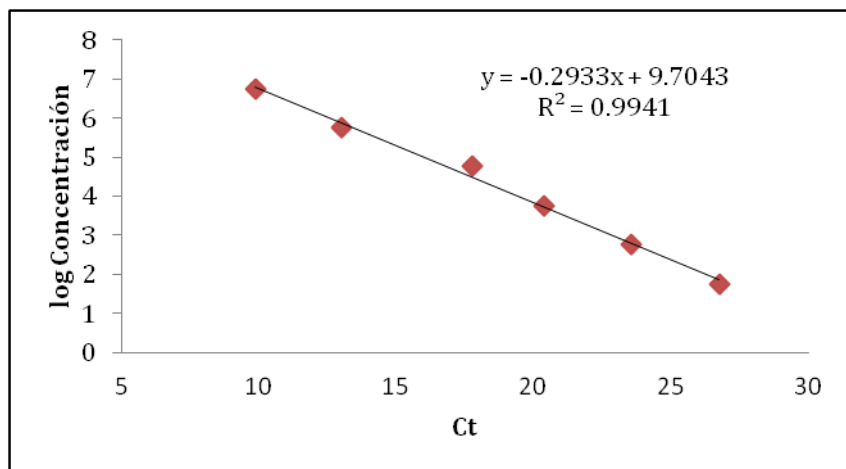


Figura 4. Curva estándar para cuantificación de la carga viral

La curva estándar fue construida con diluciones seriadas del RNA obtenido del sobrenadante de células C6/36 infectadas con la cepa control de DENV-2 NGC conteniendo $5,75 \times 10^6$ UFP/mL.

Aislamiento en cultivo celular

El total de 93 muestras de suero con resultados positivos mediante la RT-PCR en tiempo real fueron inoculadas en células C6/36 para intentar el aislamiento viral. Luego de dos pasajes, fue colectado el sobrenadante celular, a partir del cual fue confirmado el aislamiento por RT-PCR en tiempo real en 78 de las 93 muestras inoculadas (84%) (Tabla 3). La carga viral relativa de los virus aislados se encontró entre $1,17 \times 10^2$ y $7,72 \times 10^7$ UFP/mL, la misma fue obtenida a partir de la curva estándar (Figura 4). El efecto citopático observado se muestra en la figura 5.

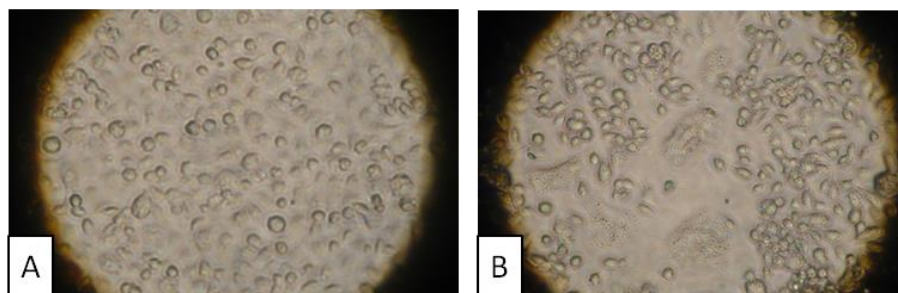


Figura 5. Efecto citopático observado en células C6/36

A: Control Negativo: Monocapa de células C6/36 sin infectar. B: Efecto citopático observado en las células C6/36 luego de 5 a 7 días post-inoculación con suero positivo mediante RT-PCR en tiempo real.

4.3 Caracterización molecular

4.3.1 Identificación de tipos de DENV

Mediante la amplificación de una región parcial del gen de la proteína NS5 fueron identificados los tipos de DENV en 49/78 (63%) de los virus aislados en cultivo celular. Los mismos se clasificaron en 31 DENV-1 y 18 DENV-2 (Figura 6). Para los aislados que no pudieron ser tipificados mediante esta reacción, se utilizó una segunda estrategia de amplificación del gen de la proteína E con *primers* tipo específicos. De esta manera se confirmó que los 29 aislados restantes correspondían a DENV-1 (Figura 7).

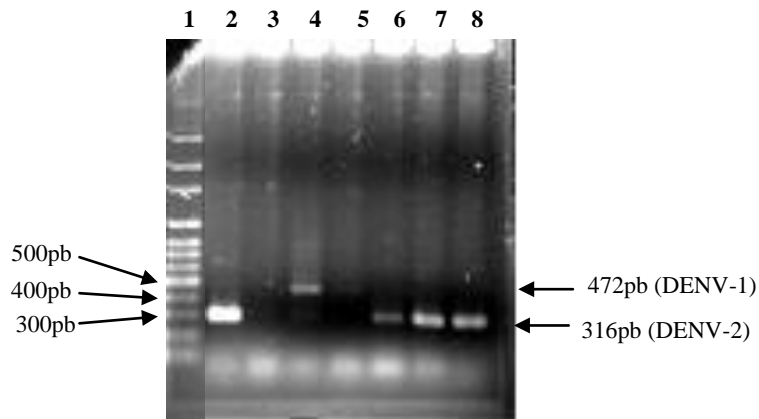


Figura 6. Resultados de la tipificación mediante amplificación del gen de la proteína NS5

Electroforesis en gel de agarosa al 1,8% de los productos amplificados obtenidos en la reacción de tipificación mediante amplificación del gen de la proteína NS5. Carril **1**: Marcador de peso molecular de 100pb (*Fermentas, EUA*); Carriles **2, 6, 7 y 8**: Muestras correspondientes a DENV-2 (316pb); Carriles **4 y 5**: Muestras correspondientes a DENV-1 (472pb); Carril **3**: Muestra sin determinar el tipo de DENV.

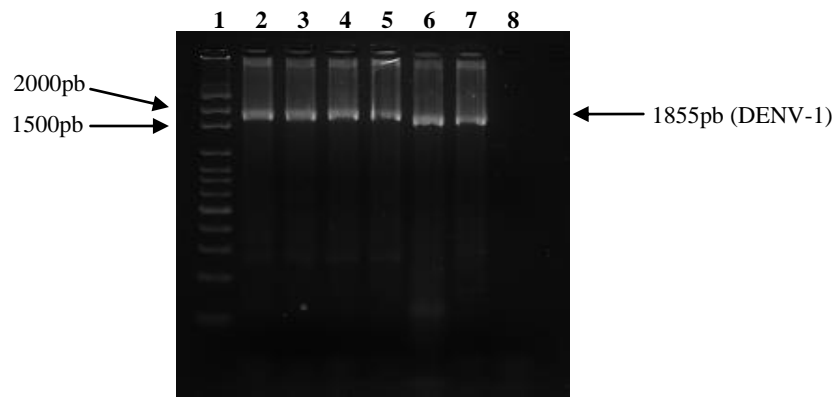


Figura 7. Resultados de la tipificación mediante amplificación del gen de la proteína E

Electroforesis en gel de agarosa al 1,8% de los productos obtenidos por amplificación del gen de la proteína E para tipificación. Carril **1**: Marcador de peso molecular 100pb (*Axygen, EUA*); Carriles **2-4**: Muestras correspondientes a DENV-1 (1855pb); Carril **5**: Control positivo de DENV-1 cepa Mochizuki (1855pb); Carril **6**: Control positivo de DENV-2 cepa NGC (1680pb); Carril **7**: Control positivo de DENV-3 cepa Be3D3 (1735pb); Carril **8**: Control Negativo (agua libre de ARNasas/ADNasas).

Finalmente, se tipificaron los 78 DENV aislados, resultando **60 (77 %) aislados de DENV-1** y **18 (23 %) aislados de DENV-2 (Tabla 4)**.

Tabla 4. Resultados de la RT-PCR en tiempo real, aislamiento y tipo viral

Código muestra (N=98)	RT-PCR tiempo real	Tm (°C)	Carga viral relativa* (UFP/mL)	Aislamiento viral	Tipo DENV
2	P	80.7	11.4	N	
3	P	78.9	197724.1	P	DENV-2
4	P	79.3	542.8	P	DENV-1
5	P	79.9	248139.8	P	DENV-1
6	P	79.1	44.1	P	DENV-1
7	P	79.3	11066.0	P	DENV-1
8	P	78.3	49830.2	P	DENV-2
9	P	80.1	13987.4	P	DENV-1
10	P	78.7	3.5	P	DENV-2
11	P	78.1	4225.4	P	DENV-2
12	P	79.3	242736.4	P	DENV-1
13	P	78.3	547.8	P	DENV-2
14	P	78.9	4.6	P	DENV-1
15	P	79.1	3.3	P	DENV-2
16	P	79.3	14588.5	P	DENV-1
17	N	72.2			
18	P	78.3	4377.9	P	DENV-2
19	P	79.5	80603.1	P	DENV-1
20	P	78.1	192480.3	P	DENV-1
21	P	78.1	38.6	P	DENV-1
22	P	79.0	193.1	P	DENV-1
23	N	72.7			
24	P	80.0	1485133.4	P	DENV-2
25	P	80.8	1908.1	P	DENV-1
26	P	80.0	352.9	P	DENV-2
27	P	79.2	2.2	P	DENV-1
28	P	77.7	305701.0	P	DENV-2
29	N	73.4			
30	P	77.9	1281.3	P	DENV-1
31	P	77.7	2.5	P	DENV-1
32	P	77.7	3.1	P	DENV-2
33	P	80.5	7925.8	P	DENV-1
34	P	79.1	16.9	P	DENV-2
35	P	78.5	9.5	P	DENV-1
36	P	77.7	2.0	N	
37	P	77.7	4.7	N	
38	P	78.7	278.6	P	DENV-1
39	P	78.5	46.0	P	DENV-1

Código muestra (N=98)	RT-PCR tiempo real	Tm (°C)	Carga viral relativa* (UFP/mL)	Aislamiento viral	Tipo DENV
40	N	73.2			
41	P	78.9	13741.2	P	DENV-1
42	P	78.7	118.8	P	DENV-1
43	P	78.3	1666.1	P	DENV-2
44	P	78.1	4.7	P	DENV-1
45	P	77.7	3.1	N	
46	P	78.3	7279.7	P	DENV-2
47	P	79.1	465484.7	P	DENV-1
48	P	79.1	18215.7	P	DENV-1
49	P	78.3	462539.0	P	DENV-2
50	P	78.5	8.2	N	
51	P	78.9	23796.1	P	DENV-1
52	P	77.8	5.3	N	
53	P	78.6	75263.1	P	DENV-1
54	P	79.0	292.2	P	DENV-1
55	P	78.6	74721.2	P	DENV-2
56	P	78.6	7.1	N	
57	P	78.4	18.2	P	DENV-1
58	P	79.0	52316.7	P	DENV-1
60	N	72.9			
61	P	78.6	519.2	P	DENV-1
62	P	78.6	579.3	P	DENV-1
63	P	78.6	3584.1	P	DENV-1
64	P	78.8	939.9	P	DENV-1
65	P	78.4	70.5	P	DENV-1
66	P	79.2	16.5	N	
67	P	79.4	35139.7	P	DENV-1
68	P	77.7	3.0	P	DENV-1
69	P	79.4	526.3	P	DENV-1
70	P	78.8	7.6	P	DENV-1
71	P	79.0	3.0	P	DENV-1
72	P	79.2	13040.4	P	DENV-1
73	P	79.0	231.4	P	DENV-1
74	P	79.0	949667.4	P	DENV-1
75	P	78.5	3.7	N	
77	P	78.4	19508.2	P	DENV-2
78	P	79.0	7.7	P	DENV-1
79	P	78.5	10.1	N	
80	P	78.5	8.1	P	DENV-1
81	P	77.7	3.7	P	DENV-1

Código muestra (N=98)	RT-PCR tiempo real	Tm (°C)	Carga viral relativa* (UFP/mL)	Aislamiento viral	Tipo DENV
82	P	79.6	485.8	P	DENV-1
83	P	77.7	2.7	P	DENV-1
84	P	79.4	16510.9	P	DENV-1
85	P	79.0	19.7	N	
86	P	77.8	13.1	N	
87	P	79.0	9.2	N	
88	P	79.8	5812.8	P	DENV-1
90	P	79.3	163260.0	P	DENV-1
91	P	79.5	48071.7	P	DENV-1
92	P	79.1	1778.6	P	DENV-1
93	P	79.5	6118.2	P	DENV-1
94	P	79.5	15185.6	P	DENV-1
95	P	79.5	2036081.8	P	DENV-1
96	P	79.7	1653038.0	P	DENV-1
97	P	79.5	48791.3	P	DENV-1
99	P	79.5	209958.8	P	DENV-1
100	P	78.5	986737.5	P	DENV-2
101	P	79.0	12.1	N	
102	P	77.7	4.5	N	
104	P	79.0	7260.1	P	DENV-1

*La carga viral relativa fue cuantificada mediante una curva estándar utilizando una cepa control de DENV-2. El aislamiento viral fue confirmado por RT-PCR en tiempo real. P: Positivo; N: Negativo; Tm: Temperatura de disociación.

En relación a la ubicación geográfica de los pacientes se observó que la mayoría, 30/78 (38,5%), provino de la ciudad de Asunción, de los cuales 21 (70%) aislados correspondieron a DENV-1 y 9 (30%) a DENV-2. Así también 10/13 (77%) de los aislados de la ciudad de Mariano Roque Alonso correspondieron a DENV-1. Se detectaron ambos tipos de DENV en Asunción, Mariano Roque Alonso, San Lorenzo y Areguá. (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución geográfica de los aislados tipificados

Frecuencia (N=78)

Ciudad	DENV-1	DENV-2	Total aisladas por ciudad	Total colectadas por ciudad
Asunción	21	9	30	37
MRA	10	3	13	16
San Lorenzo	2	3	5	6
Luque	4	-	4	5
Limpio	3	-	3	4
Ñemby	3	-	3	5
Areguá	1	1	2	2
Lambaré	0	2	2	2
Capiatá	2	-	2	4
Fndo. de la Mora	2	-	2	3
Emboscada	1	-	1	1
Itá	1	-	1	1
Villa Elisa	1	-	1	2
Villa Hayes	1	-	1	1
Sin datos	8	-	8	8
J. A. Saldívar	-	-	-	1
Total	60	18	78	98

MRA: Mariano Roque Alonso; Fndo. de la Mora: Fernando de la Mora; J.A. Saldívar: Juan Augusto Saldívar.

La distribución geográfica de los aislados tipificados fue representada en un mapa, en el mismo se observó que ambos tipos de DENV prácticamente se distribuyeron en toda el área que comprendió a las ciudades de las cuales provinieron los pacientes (Figura 8).

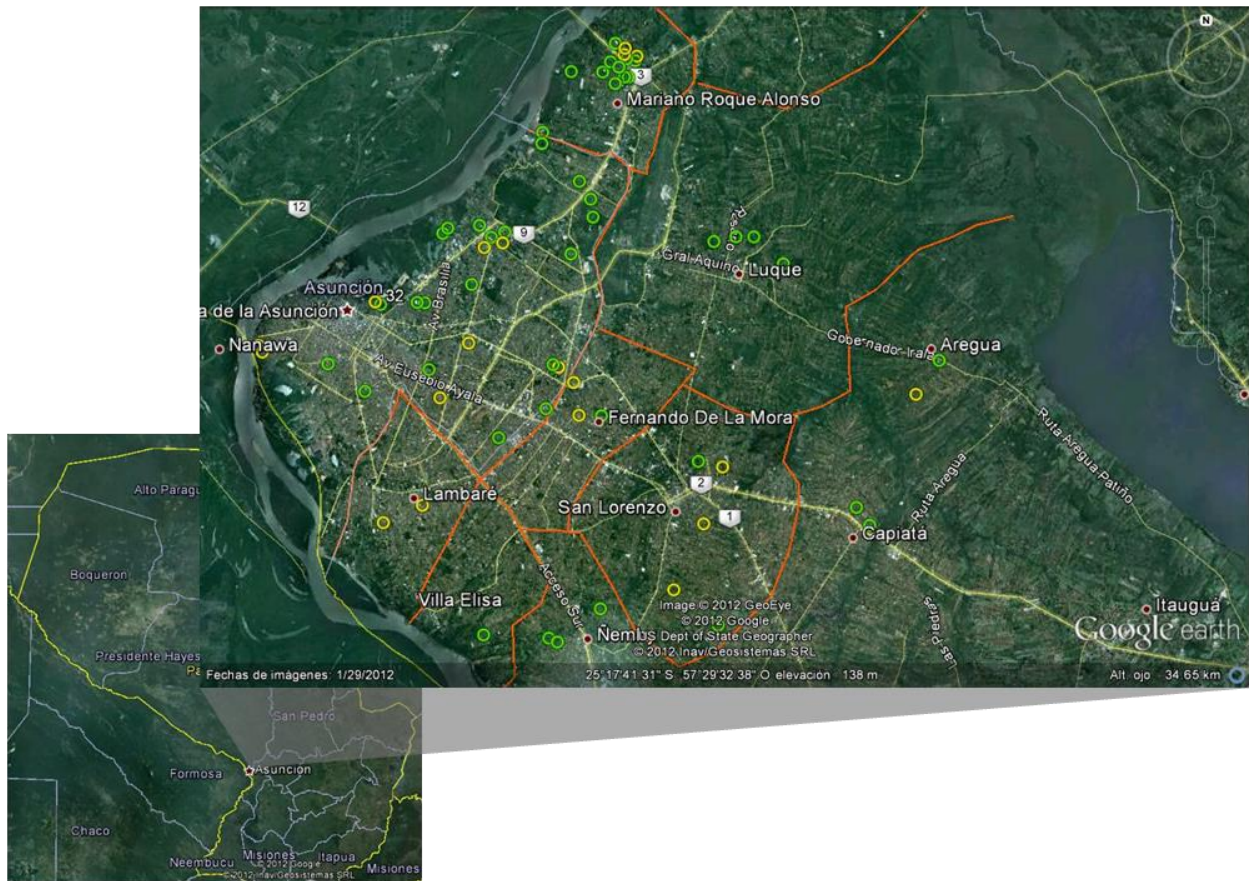


Figura 8. Mapa de distribución de los aislados de DENV-1 y DENV-2

El mapa superior corresponde a una ampliación a nivel de la ciudad de Asunción y ciudades contiguas, del Paraguay (mapa inferior). Se puede observar la distribución geográfica de los aislados de DENV-1 y DENV-2 representados por círculos de color verde y amarillo respectivamente. A fin de poder diferenciar las ciudades y sus límites (marcados color anaranjado) la foto fue ampliada por lo que aislados provenientes de Villa Hayes, Emboscada (Norte) e Itá (Sur) quedaron fuera de la figura por encontrarse más alejados. 8 aislados no pudieron ser ubicados por falta de datos de procedencia de los pacientes.

4.3.2 Secuenciación del gen de la proteína E

Fragmentos de ADN que abarcaron todo el gen de la proteína E de 60 aislados de DENV-1 (1855 pb) y 18 DENV-2 (1680 pb), respectivamente, fueron amplificados y purificados para ser sometidos a la secuenciación nucleotídica. Los fragmentos purificados fueron analizados con el bioanalizador de fragmentos. El análisis de los electroferogramas obtenidos indicó la presencia de una única señal, proporcional a la concentración del fragmento purificado y correspondiente al tamaño acorde al esperado, corroborando así la purificación de los fragmentos deseados (Figura 9). Los mismos fueron representados como una banda única en un gel “virtual” (Figura 10). La concentración de ADN se encontró en el rango de 2,1 a 125,1 ng/ μ L.

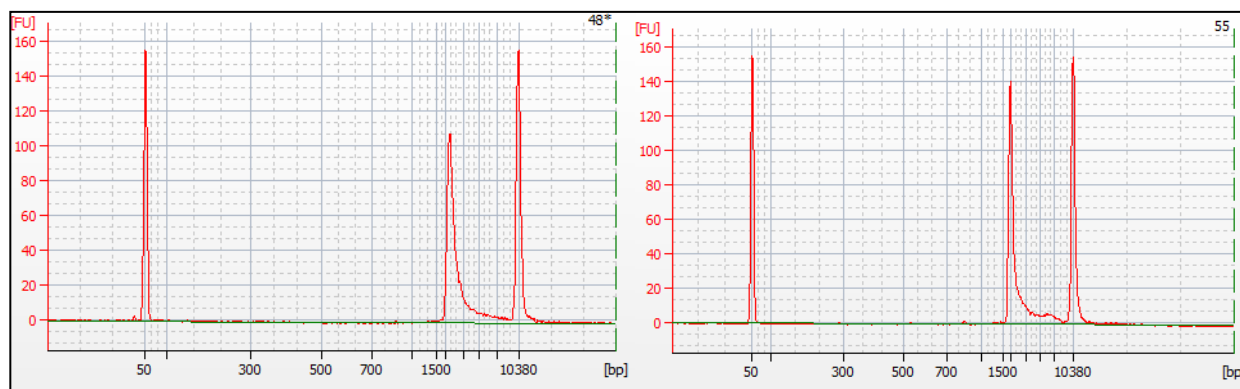


Figura 9. Electroferograma obtenido del análisis de los fragmentos purificados

Electroferogramas obtenidos del análisis utilizando el bioanalizador de fragmentos. El gráfico indica “intensidad de fluorescencia (FU) vs. Tamaño del fragmento (pb)”. La fluorescencia es proporcional a la concentración del producto amplificado. Los picos situados en los extremos laterales corresponden a marcadores de concentraciones conocidas utilizados como controles internos. Los picos que se encuentran entre los controles internos corresponde al fragmento purificado de las muestras: 48 (DENV-1) y 55 (DENV-2).

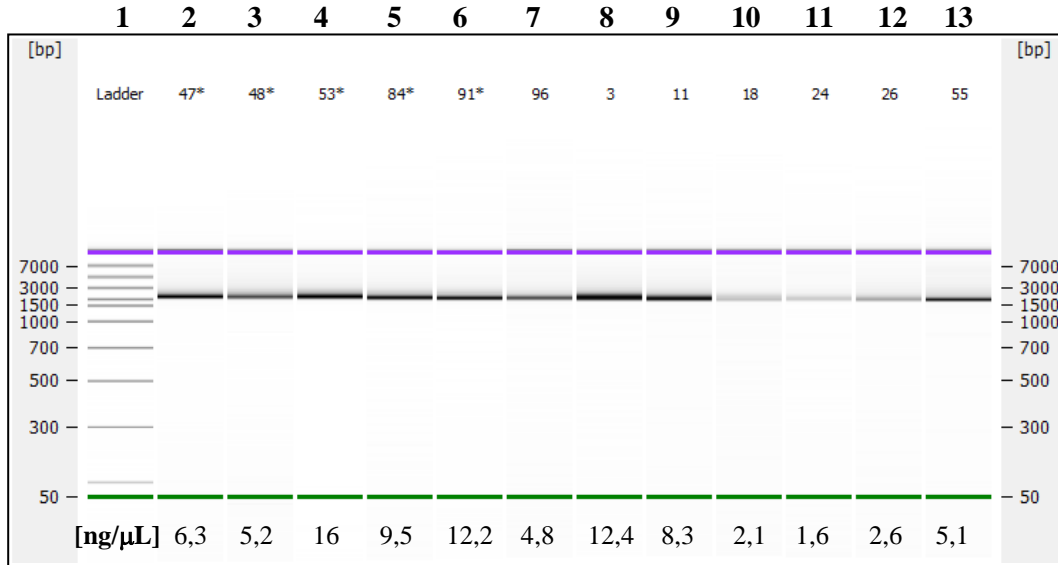


Figura 10. Representación del gel virtual obtenido del análisis de los fragmentos purificados

Representación de la corrida electroforética en gel “virtual” de los fragmentos purificados luego del análisis con el bioanalizador de fragmentos. Carril **1**: Marcador de peso molecular; Carriles **2-7**: Aislados de DENV-1 (códigos: 47, 48, 53, 84, 91, 96); Carriles **8-13**: Aislados de DENV-2 (códigos: 3,11,18,24,26,55). La intensidad de las bandas es proporcional a la concentración de los productos amplificados, las mismas se indican en la parte inferior de la figura en ng/μL.

4.3.3 Análisis filogenético de DENV basados en la secuencia del gen de la proteína E

Se logró obtener secuencias completas del gen de la proteína E a partir de 45/60 aislados de DENV-1 y 11/18 aislados de DENV-2 (1485 pb). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas con las de aislados virales de diferentes países.

El análisis filogenético de la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 mostró la existencia de cinco agrupaciones acordes con los cinco genotipos ya descritos. Las cepas de DENV-1 descritas en este estudio se agruparon dentro del genotipo V, junto con cepas aisladas principalmente en las Américas. En dicho genotipo también se encontraron cepas aisladas en Paraguay en años anteriores pero formando diferentes grupos (Figura 11).

Para una mayor claridad, se amplió la imagen del árbol filogenético a nivel de la ramificación del genotipo V, donde se encontraron los DENV-1 aislados en Paraguay (Figura 12). Interesantemente, la topología del árbol filogenético reveló que las cepas de DENV-1 aisladas en Paraguay se distribuyeron en tres grupos que fueron denominados I, II y III, los cuales fueron soportados con altos valores de bootstrap ($\geq 88\%$). El grupo I comprendió a las cepas aisladas en 2011, relacionadas filogenéticamente a cepas aisladas en Río de Janeiro, Brasil en 2010 y 2011 (Figura 12, grupo I), así como también con un grupo de cepas aisladas en el Caribe, específicamente en Haití (HA/DB066/2010), Rca. Dominicana (DR/DB004/2007) y Puerto Rico (PR/DB009/2007). El grupo II incluyó a una cepa aislada en Paraguay en el 2000 agrupada con cepas aisladas en Argentina en el mismo año (Figura 12, grupo II). Por último, el grupo III comprendió a cepas paraguayas aisladas entre 1999 y 2000 relacionadas filogenéticamente con cepas aisladas en Argentina en el año 2000 (Figura 12, grupo III).

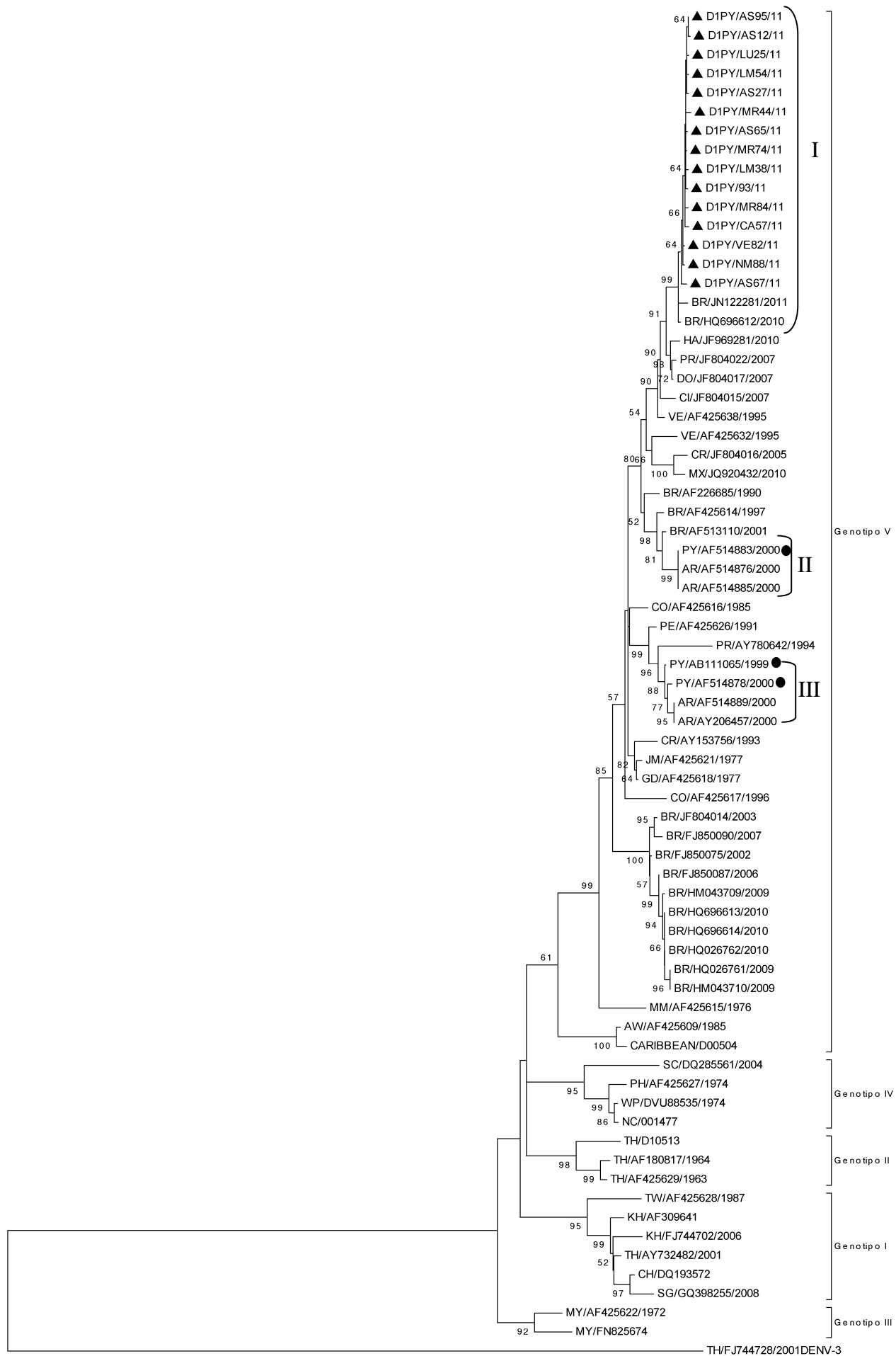


Figura 11. Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de aislados de DENV-1 mediante el método de Neighbor-Joining

Figura 11. Árbol filogenético derivado de la secuencia del gen de la proteína E de los aislados de DENV-1 en Asunción (2011) y de aislados provenientes de diferentes países utilizando el método de *Neighbor-Joining*. Las 15 cepas virales aisladas en este estudio se encuentran marcadas con ▲. Las cepas aisladas en el país en años anteriores se encuentran marcadas con ●. Las codificaciones de las cepas están compuestas de: Iniciales del país de aislamiento/Código de acceso al *GenBank*/Año de aislamiento. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue el de Tamura Nei, considerando una tasa de variación con distribución gamma (G=1). La fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 50 y están indicados en los nodos; las longitudes de las ramas horizontales se encuentran a escala y son proporcionales al porcentaje de divergencia. El árbol fue enraizado utilizando una cepa de DENV-3 aislada en Tailandia (Código de acceso FJ744728). La barra de escala representa 0,05 variaciones de nucleótidos por sitio.

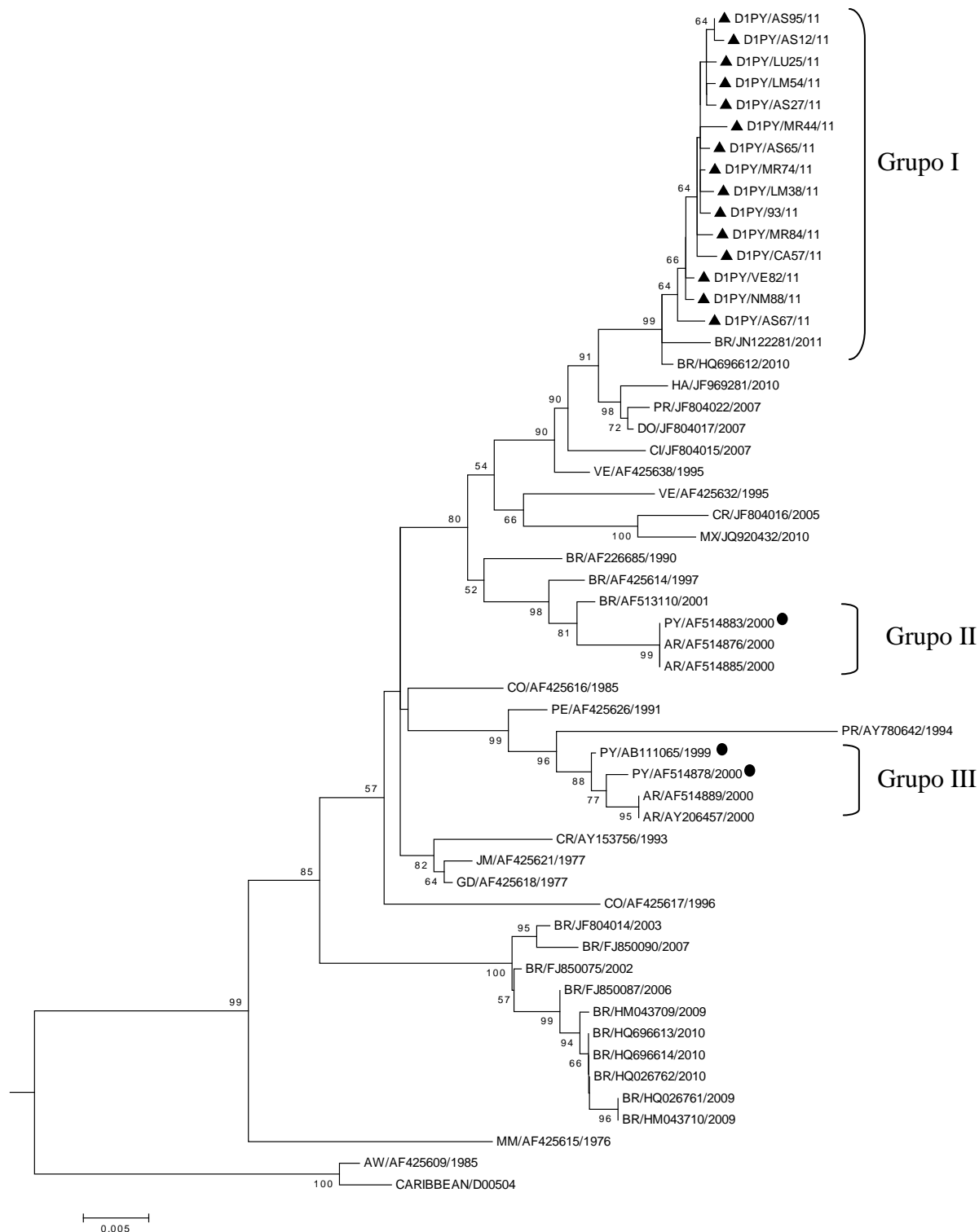


Figura 12. Representación ampliada del genotipo V obtenida del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 mediante el método de Neighbor-Joining

Representación ampliada del genotipo V de DENV-1 a partir del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de los aislados de DENV-1 en Asunción (2011) y de aislados provenientes de diferentes países utilizando el método de *Neighbor-Joining*. Las 15 cepas virales aisladas en este estudio se encuentran marcadas con ▲. Las cepas aisladas en el país en años anteriores se encuentran marcadas con ●. Las codificaciones de las cepas están compuestas de: Iniciales del país de aislamiento/Código de acceso al *GenBank*/Año de aislamiento. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue el de Tamura Nei, considerando una tasa de variación con distribución gamma (G=1). La

fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 50 y están indicados en los nodos; las longitudes de las ramas horizontales se encuentran a escala y son proporcionales al porcentaje de divergencia. La barra de escala representa 0,005 variaciones de nucleótidos por sitio.

Se observó un alto porcentaje de identidad nucleotídica entre las cepas de DENV-1 caracterizadas en este estudio (99,5 a 100%), donde 31/45 (69%) fueron idénticas. Así, 15 secuencias presentaron al menos una variación nucleotídica y fueron incluidas para el análisis filogenético.

La comparación entre las cepas de DENV-1 aisladas en el estudio y las cepas aisladas en Brasil que fueron agrupadas en el mismo grupo (grupo I) mostró una divergencia nucleotídica de 0,3 a 0,7%, así también se observó una divergencia de 1 a 1,3% con las cepas aisladas en Haití, Puerto Rico y Rca. Dominicana (Tabla 5). Esto concordó con lo observado en el árbol filogenético descrito previamente.

Por otro lado con las cepas aisladas en el país en años anteriores se observó una divergencia de 2,9 a 3,9 % a nivel de nucleótidos y de 0,8 a 1,2 % a nivel de aminoácidos (Tabla 6).

Tabla 6. Divergencia nucleotídica y aminoacídica entre cepas de DENV-1 aisladas en Paraguay y otras recuperadas del GenBank basados en la secuencia del gen de la proteína E

Aislados en Paraguay en 2011: (1) D1PY/MR74/11 (2) D1PY/LU25/11, (3) D1PY/VE82/11, (4) D1PY/NM88/11, (5) D1PY/MR84/11, (6) D1PY/MR44/11, (7) D1PY/LM54/11, (8) D1PY/LM38/11, (9) D1PY/CA57/11, (10) D1PY/AS95/11, (11) D1PY/AS67/11, (12) D1PY/AS65/11, (13) D1PY/AS27/11, (14) D1PY/AS12/11, (15) D1PY/93/11. **Aislados en Paraguay en años anteriores:** (16) 99-36-1HuNIID (PY/AB111065/1999), (17) 280par00 (PY/AF514878/2000), (18) 259par00 (PY/AF514883/2000). **Aislados en Brasil:** (19) 15_2010/BR/RJ/2010 (BR/HQ696612/2010), (20) 0122_2011/BR/RJ/2011 (BR/JN122281/2011). **Aislados en Caribe:** (21) DR/DB004/2007 (DO/JF804017/2007), (22) PR/DB009/2007 (PR/JF804022/2007), (23) HA/DB066/2010 (HA/JF969281/2010). *Las codificaciones entre paréntesis son las que figuran en los árboles filogenéticos (Figuras 11 y 12).*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		0.0	0.2	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
2	0.1		0.2	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
3	0.1	0.2		0.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.8	1.0	0.8	0.0	0.2	0.2	0.0	0.2
4	0.1	0.2	0.1		0.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.8	1.0	0.8	0.0	0.2	0.2	0.0	0.2
5	0.1	0.2	0.3	0.3		0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
6	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3		0.4	0.2	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.2	0.4	0.6	0.6	0.4	0.6
7	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	1.0	1.2	1.2	0.4	0.6	0.6	0.4	0.6
8	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2		0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
9	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3		0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
10	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2		0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
11	0.3	0.4	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4		0.4	0.4	0.4	0.4	1.0	1.2	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
12	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.5		0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
13	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.4	0.2		0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
14	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.5	0.3	0.2		0.0	0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
15	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.4	0.2	0.1	0.2		0.8	1.0	1.0	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4
16	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6	3.6		0.2	1.2	0.8	1.0	1.0	0.8	1.0
17	3.8	3.9	3.8	3.8	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.7	3.8	3.9	3.9	3.9	0.3		1.4	1.0	1.2	1.2	1.0	1.2
18	3.0	3.1	3.0	3.0	3.2	3.2	3.1	3.0	3.2	3.1	3.1	2.9	3.1	3.2	3.0	3.2	3.5		0.8	1.0	1.0	0.8	1.0
19	0.3	0.4	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	3.3	3.6	2.8		0.2	0.2	0.0	0.2
20	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	3.6	3.9	3.2	0.5		0.4	0.2	0.4
21	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	3.3	3.6	2.8	0.8	1.2		0.2	0.4
22	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	3.5	3.8	3.0	1.0	1.3	0.3		0.2
23	1.1	1.2	1.1	1.1	1.3	1.3	1.2	1.3	1.1	1.2	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2	3.6	3.9	3.0	1.1	1.4	0.5	0.6	

La divergencia nucleotídica (%) se muestra debajo de la diagonal y la divergencia aminoacídica (%) se muestra encima de la diagonal.

El análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-2 demostró la existencia de seis agrupaciones conforme con los seis genotipos ya descritos. Las cepas de DENV-2 caracterizadas en el presente estudio se agruparon dentro del genotipo Americano/Asiático, junto con cepas aisladas en las Américas. Cepas aisladas en Paraguay en años anteriores también se encontraron dentro del mismo genotipo pero formando grupos distintos (Figura 13).

Para visualizar con mayor claridad, se amplió la ramificación del genotipo Americano/Asiático, al cual pertenecieron las cepas de DENV-2 aisladas en el estudio (Figura 14). La topología del árbol filogenético mostró que las cepas de DENV-2 aisladas en Paraguay se distribuyeron en tres grupos soportados con altos valores de *bootstrap* ($\geq 96\%$), los mismos fueron denominados I, II y III. El grupo I incluyó cepas aisladas en el 2011 en este estudio, relacionadas filogenéticamente con cepas aisladas en Brasil entre 2007-2010 (Figura 14, grupo I). El grupo II comprendió a cepas paraguayas aisladas en 2001 y 2005, las cuales se relacionaron filogenéticamente con una cepa aislada en Brasil en 2006 (Figura 14, grupo II). El grupo III incluyó a una cepa aislada en el país en 2005 relacionada filogenéticamente con una cepa aislada en Brasil en 1998 (Figura 14, grupo III).

Además, la topología del árbol filogenético sugirió la relación filogenética del grupo I con una cepa aislada en Rca. Dominicana en 2003, soportada con un valor de *bootstrap* de 99% (Figura 14).

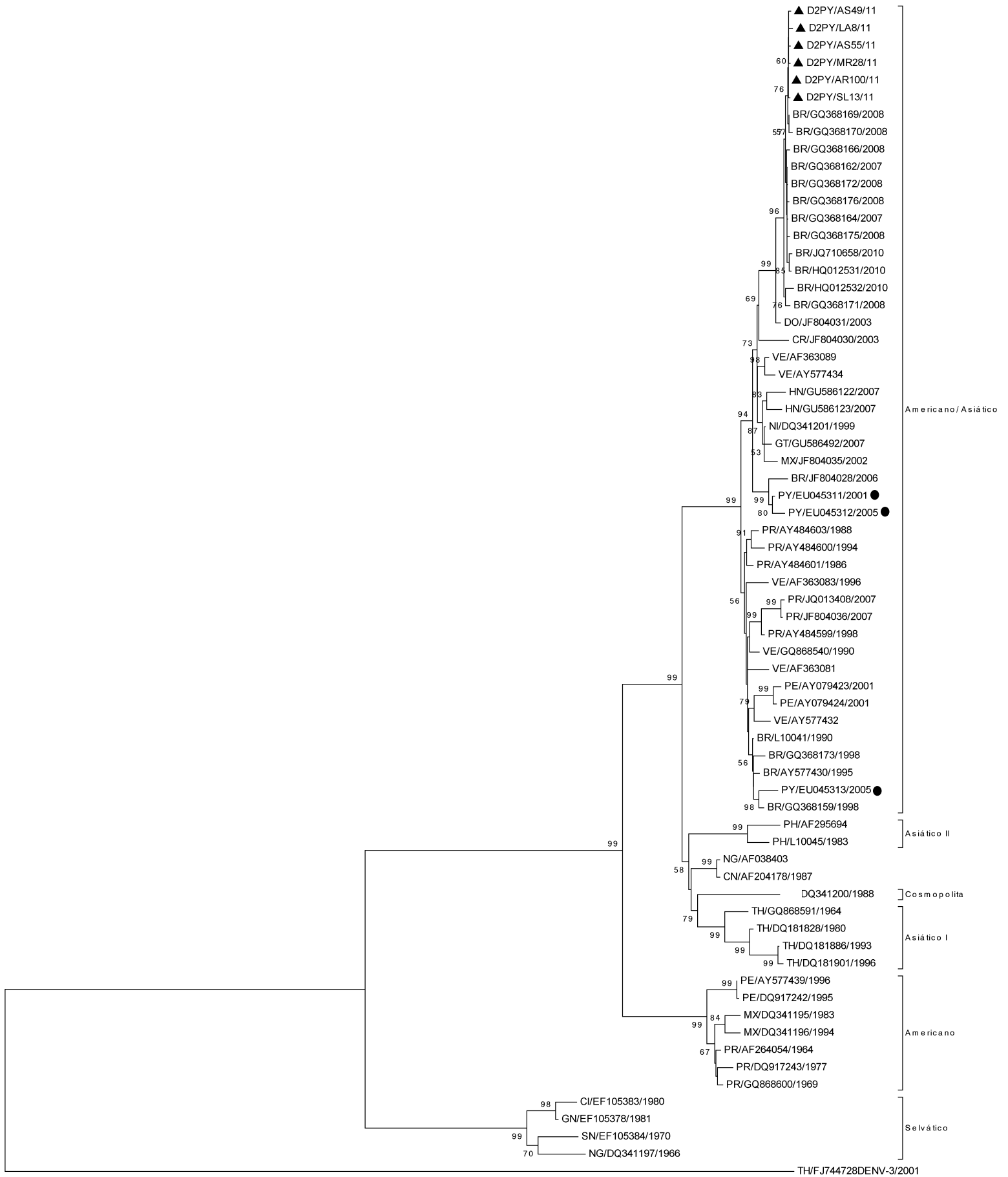


Figura 13. Árbol filogenético derivado de la secuencia del gen de la proteína E de los 6 aislados de DENV-2 en Asunción (2011) y de aislados provenientes de diferentes países utilizando el método de *Neighbor-Joining*. Las 6 cepas virales aisladas en este estudio se encuentran marcadas con ▲. Las cepas aisladas en el país en años anteriores se encuentran marcadas con ●. Las codificaciones de las cepas están compuestas de: Iniciales del país de aislamiento/Código de acceso al *GenBank*/Año de aislamiento. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue el de Tamura Nei, considerando una tasa de variación con distribución gamma ($G=1$). La fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 50 y están indicados en los nodos; las longitudes de las ramas horizontales se encuentran a escala y son proporcionales al porcentaje de divergencia. El árbol fue enraizado utilizando una cepa de DENV-3 aislada en Tailandia. La barra de escala representa 0,05 variaciones de nucleótidos por sitio.

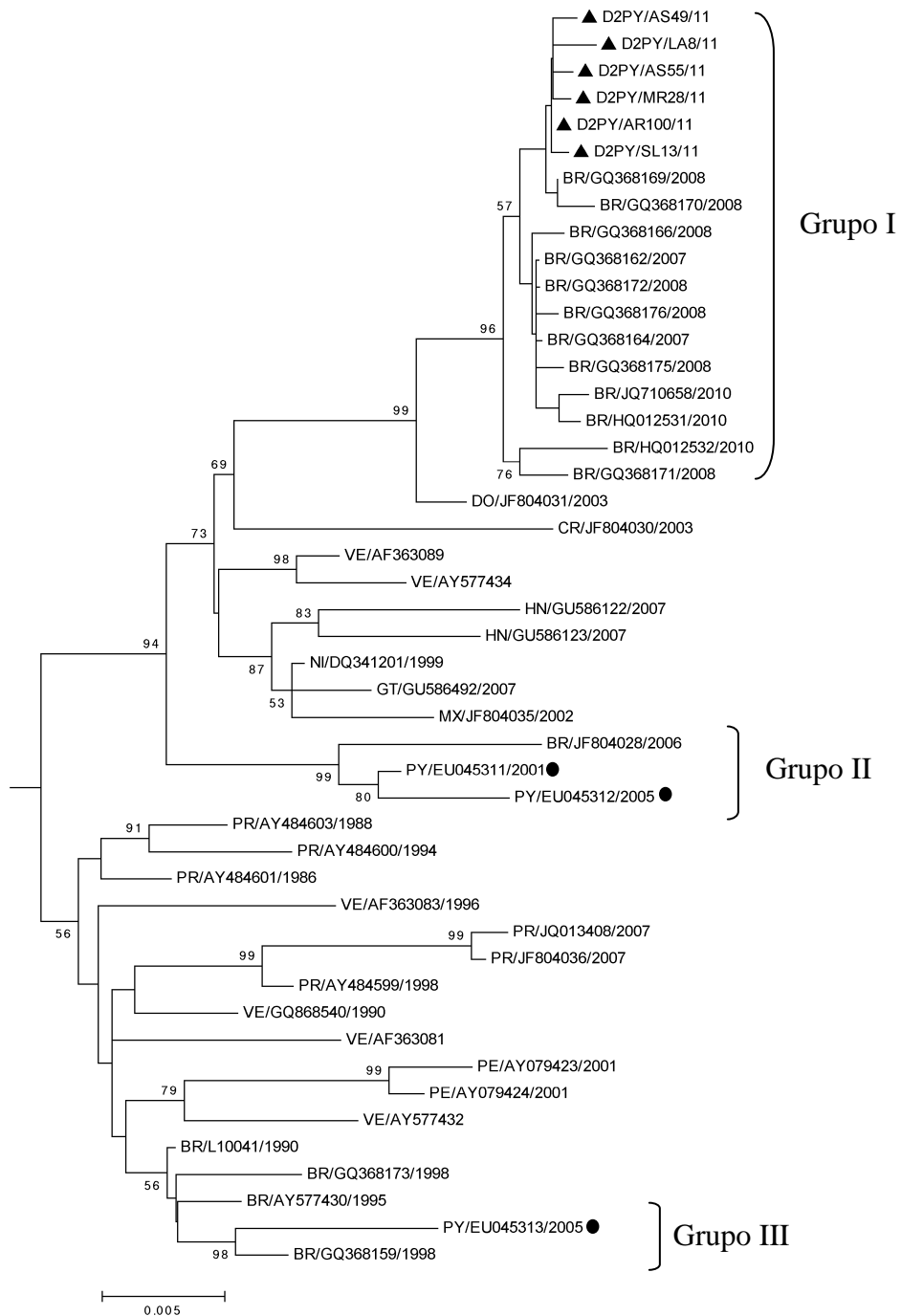


Figura 14. Representación ampliada del genotipo Americano/Asiático obtenida del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de aislados de DENV-2 mediante el método de Neighbor-Joining

Representación ampliada del genotipo Americano/Asiático a partir del árbol filogenético derivado de la secuencia del gen de la proteína E de los 6 aislados de DENV-2 en Asunción (2011) y de aislados provenientes de diferentes países utilizando el método de *Neighbor-Joining*. Las 6 cepas virales aisladas en este estudio se encuentran marcadas con ▲. Las cepas aisladas en el país en años anteriores se encuentran marcadas con ●. Las codificaciones de las cepas están compuestas de: Iniciales del país de aislamiento/Código de acceso al *GenBank*/Año de aislamiento. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue el de Tamura Nei, considerando una tasa de variación con distribución gamma ($G=1$). La fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000

réplicas, se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 50 y están indicados en los nodos; las longitudes de las ramas horizontales se encuentran a escala y son proporcionales al porcentaje de divergencia. El árbol fue enraizado utilizando una cepa de DENV-3 aislada en Tailandia. La barra de escala representa 0,05 variaciones de nucleótidos por sitio.

Entre las cepas de DENV-2 aisladas en el presente estudio se observó alto porcentaje de identidad nucleotídica (99,7 a 100%), de las cuales 6/11 (54%) presentaron al menos una variación nucleotídica y se incluyeron en el análisis filogenético.

La comparación entre las cepas de DENV-2 aisladas en el estudio con las cepas aisladas en Brasil (2007-2010) agrupadas en el grupo I, demostró una divergencia nucleotídica de 0,1 a 0,8%, así también se observó una divergencia de 0,9 a 1% con una cepa de Rca. Dominicana aislada en 2003 (Tabla 7). Esto estuvo acorde a lo demostrado en el árbol filogenético descrito previamente.

Además, comparando con las cepas aisladas en el país en años anteriores se observó una divergencia nucleotídica de 2,4 a 3,6% y una divergencia aminoacídica de 1 a 1,6% (Tabla 7).

Tabla 7. Divergencia nucleotídica y aminoacídica entre cepas de DENV-2 aisladas en Paraguay y otras recuperadas del GenBank basados en la secuencia del gen de la proteína E

Aislados en Paraguay en 2011: (1) **D2PY/AR100/11**, (2) **D2PY/SL13/11**, (3) **D2PY/AS49/11**, (4) **D2PY/MR28/11**, (5) **D2PY/AS55/11**, (6) **D2PY/LA8/11**. **Aislados en Paraguay en años anteriores:** (7) **D2PY-04/01** (PY/EU045311/2001), (8) **D2PY-21/05** (PY/EU045312/2005), (9) **D2PY-22/05** (PY/EU045313/2005). **Aislados en Brasil:** (10) **2007/BR/88034** (BR/GQ368164/2007), (11) **2007/BR/87183** (BR/GQ368162/2007), (12) **2008/BR/305** (BR/GQ368169/2008), (13) **2008/BR/312** (BR/GQ368170/2008), (14) **2008/BR/246** (BR/GQ368166/2008), (15) **2008/BR/T1** (BR/GQ368176/2008), (16) **2008/BR/337** (BR/GQ368172/2008), (17) **2008/BR/T2** (BR/GQ368175/2008), (18) **2008/BR/316** (BR/GQ368171/2008), (19) **692/2010/BR/RJ/2010** (BR/JQ710658/2010), (20) **BR0023/RJ/2010** (BR/HQ012531/2010), (21) **BR0199/RJ/2010** (BR/HQ012532/2010). **Aislado en Caribe:** (22) **DR/DB018/2003** (DO/JF804031/2003). *Las codificaciones entre paréntesis son las que figuran en los árboles filogenéticos (Figuras 13 y 14).*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1		0.2	0.2	0.0	0.2	0.0	1.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
2	0.1		0.4	0.2	0.4	0.2	1.2	1.2	1.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.0	0.4
3	0.1	0.2		0.2	0.4	0.2	1.2	1.2	1.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
4	0.1	0.1	0.2		0.2	0.0	1.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
5	0.1	0.1	0.2	0.1		0.2	1.2	1.2	1.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
6	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2		1.0	1.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
7	2.4	2.5	2.6	2.5	2.5	2.6		0.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	1.0	1.2	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2
8	2.8	2.9	3.0	2.9	2.9	3.0	0.6		0.8	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	1.0	1.2	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2
9	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	2.9	3.2		1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.6	1.4	1.6	1.4	1.4	1.4	1.6	1.6
10	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	2.4	2.8	3.5		0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
11	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	2.4	2.8	3.5	0.0		0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
12	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	2.5	2.9	3.6	0.1	0.1		0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
13	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	2.6	3.0	3.7	0.3	0.3	0.1		0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
14	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	2.6	3.0	3.6	0.1	0.1	0.3	0.4		0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
15	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	2.5	2.9	3.6	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2		0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
16	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	2.4	2.8	3.5	0.0	0.0	0.1	0.3	0.1	0.1		0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
17	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	2.5	2.9	3.6	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1		0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
18	0.5	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	2.6	2.9	3.6	0.3	0.3	0.5	0.6	0.5	0.4	0.3	0.4		0.0	0.0	0.2	0.2
19	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.6	2.6	3.0	3.8	0.3	0.3	0.4	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.6		0.0	0.2	0.2
20	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5	2.9	3.7	0.2	0.2	0.3	0.5	0.3	0.3	0.2	0.3	0.5	0.2		0.2	0.2
21	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	2.8	3.2	3.8	0.5	0.5	0.6	0.7	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7		0.4
22	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	2.3	2.7	3.4	0.7	0.7	0.8	0.9	0.8	0.7	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9	1.0	

La divergencia nucleotídica (%) se muestra debajo de la diagonal y la divergencia aminoacídica (%) se muestra encima de la diagonal.

5. DISCUSIÓN

La enfermedad del dengue se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la salud pública a nivel mundial; así, en las tres últimas décadas se ha producido un llamativo aumento de la incidencia de esta enfermedad, registrándose 4,5 veces más casos reportados sólo en las Américas (4, 118). En la actualidad, los cuatro tipos del DENV se pueden encontrar en casi todos los ambientes urbanos y peri-urbanos de las regiones tropicales y subtropicales donde los principales vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* están presentes. Debido a la distribución global de estos vectores, casi un tercio de la población humana mundial se encuentra en riesgo de infección (24).

El estudio de la variación del DENV es especialmente importante para entender mejor los mecanismos involucrados con su patogénesis (33). Así también, la evolución de los genotipos del DENV puede conducir a cambios fenotípicos en los virus que pueden alterar su potencial de causar epidemias con distintos grados de gravedad de la enfermedad, por lo que estudios evolutivos basados en análisis filogenéticos combinados con datos epidemiológicos son útiles para investigar la asociación entre los genotipos del DENV con la gravedad de la enfermedad (15, 46, 142, 153).

Teniendo en cuenta que el dengue tiene un impacto importante en la salud pública en Paraguay y destacando el valor de aportar datos de variabilidad genética del DENV aislados en el país, en el presente trabajo se ha estudiado la epidemiología molecular del DENV aislados de pacientes que acudieron al Hospital Central de IPS entre febrero y junio del 2011.

Estudios previos han demostrado la asociación entre la carga viral y la gravedad de la enfermedad (154, 155). Si bien esta correlación podría aportar información acerca de la patogénesis de la enfermedad, en el presente estudio no fue posible correlacionar la carga viral con la gravedad de la enfermedad debido a que todas las muestras correspondieron a pacientes

con dengue y no fue posible acompañar la evolución de los mismos ni coleccionar muestras de casos graves.

Por otro lado, un alto porcentaje de aislamiento viral en cultivo celular (84%) fue alcanzado, comparable con un estudio previo realizado en Singapur el cual reportó 88% de virus aislados a partir de muestras positivas por PCR. En el mencionado estudio destacaron que el corto trayecto para el transporte de las muestras al laboratorio podría asegurar la integridad de las muestras biológicas, así como también la colecta en etapa temprana de la enfermedad posibilitaría contar con mayor carga y viabilidad viral (107). Así, la colecta de muestras dentro de los 5 primeros días de iniciados los síntomas de la enfermedad, el adecuado transporte y conservación de las mismas, sumado al hecho que se utilizaron muestras con resultados positivos mediante RT-PCR en tiempo real podrían explicar el alto porcentaje de aislamiento viral en nuestro estudio.

La identificación de los tipos correspondientes a los virus aislados, fue realizada utilizando un protocolo de reacción modificado del ensayo de *Multiplex Nested* RT-PCR (PCR anidada múltiple) descrito previamente por *Bronzoni*, que amplifica una región de la proteína NS5 de flavivirus, incluyendo los cuatro tipos de DENV (28). Este protocolo modificado fue optimizado a un único paso por *Poloni y col.* a fin de minimizar el riesgo de contaminaciones cruzadas que pueden producirse en la amplificación en múltiples etapas, sin embargo observaron una baja sensibilidad de la reacción (156). La adaptación de reacciones de este tipo ya ha sido descrita en la literatura. *Harris y col.* adaptaron un ensayo de *nested* RT-PCR descrito previamente por *Lanciotti y col.* y desarrollaron un ensayo de un solo paso para realizar la retrotranscripción del ARN viral y amplificar fragmentos específicos para cada tipo de DENV (97, 102).

A pesar de la sensibilidad baja de la reacción mencionada por *Poloni y col.*, la misma fue utilizada debido a que en nuestro estudio las muestras a testar correspondieron a aislados de DENV ya confirmados mediante RT-PCR en tiempo real y la mayoría con títulos altos de carga viral. Sin embargo, no todas las muestras pudieron ser tipificadas utilizando esta reacción, por lo que se optó por una segunda estrategia amplificando el gen de la proteína E.

En el presente estudio se detectó la circulación simultánea de DENV-1 (77%) y DENV-2 (23%) que fueron aislados de pacientes provenientes de Asunción, y ciudades cercanas en 2011. La presencia de ambos tipos de DENV en el país concordó con lo reportado por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del país (MSPyBS), con la diferencia de que en nuestro estudio se detectaron más casos de DENV-1 (Tabla 5) mientras que en el reporte oficial del mencionado Ministerio se indicó el predominio de DENV-2 (135). Esto pudo deberse a que el estudio fue realizado en un centro hospitalario al cual acuden principalmente individuos provenientes de Asunción, además el muestreo no fue probabilístico y la cantidad de muestras tipificadas no fue muy grande, por tanto, en base a los resultados obtenidos en el estudio no se pueden realizar inferencias a nivel país.

Según la distribución geográfica de las cepas virales aisladas (Tabla 5 y Figura 8), se observó que la mayoría provenía de la ciudad de Asunción, hecho que era de esperarse dada la ubicación del hospital donde las muestras fueron colectadas. Sin embargo, vale la pena destacar que según reportes del MSPyBS, en la región que abarca la ciudad de Asunción y el área metropolitana del Dpto. Central (Capiatá, Fndo. de la Mora, Lambaré, Limpio, Luque, Mariano Roque Alonso, Ñemby, San Lorenzo y Villa Elisa) se registró la mayor cantidad de casos a nivel país, correspondiendo al 54,5% (22.979/42.264) del total de casos registrados. La detección de un alto porcentaje de casos provenientes de la ciudad de Mariano Roque Alonso en nuestro estudio coincidió con un brote importante reportado en esta ciudad (135).

En Paraguay, la primera epidemia de dengue (1988-1989) fue atribuida al DENV-1 y luego de 10 años, causó otra gran epidemia (134). El DENV-2 se introdujo al país en el 2001, en el 2010, se detectó a éste como predominante sobre DENV-1 y DENV-3, en ese año fueron reportados casos de dengue grave y muertes. En el 2011, se identificó la circulación de DENV-1 y DENV-2 en forma simultánea, con predominio de este último. En ese año se produjo la mayor epidemia en Paraguay en cuanto a cantidad de casos y muertes con respecto a años anteriores (135). De hecho, el DENV-2 siguió circulando en el país en el 2012 (137).

Se considera que la patogénesis de los casos graves del dengue resulta de una compleja interacción, aun no muy bien comprendida, entre varios factores asociados al virus, huésped, a los mecanismos de la inmunidad, entre otros (115). También se debe tener en cuenta que varios estudios seroepidemiológicos apoyan la hipótesis que la infección previa con un tipo de DENV puede sentar las bases para una infección más letal por un tipo diferente (157, 158). Así la circulación de varios tipos de DENV en nuestro país podría tornar a la población susceptible de desarrollar las formas graves en las subsiguientes epidemias. Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos de la circulación de los diferentes tipos de DENV mencionados anteriormente y considerando que el DENV-2 ha sido frecuentemente asociado a grandes epidemias y a manifestaciones clínicas más graves, se podría considerar la posibilidad de una cierta asociación entre la re-emergencia del DENV-2 en el país en el 2010 y la aparición de casos graves y muertes (2, 157). Sin embargo, se necesitan estudios profundos para poder establecer dicha relación.

Por todo lo citado anteriormente, se recalca la necesidad de realizar más estudios para tratar de explicar la tendencia al aumento de casos graves y muertes a causa del dengue en Paraguay (137).

Análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E

La caracterización genética del DENV se ha convertido en un tema crítico para comprender los patrones epidémicos y la dispersión del virus (48). De allí la importancia de este estudio, se analizó la secuencia del gen de la proteína E debido a que la misma se encuentra involucrada en la inducción de la respuesta inmune por parte del huésped, media la unión con los receptores específicos de la superficie celular y constituye el mayor componente antigénico en la superficie del virus (37).

La introducción del **DENV-1** en las Américas ocurrió a través de Jamaica en 1977, proveniente posiblemente de Asia o África, siendo responsable de varias epidemias en diferentes países en los siguientes años (119, 120). Varios trabajos se han enfocado en estudiar la epidemiología molecular a fin de determinar el origen y la evolución del DENV-1 en diferentes países (45, 50, 159, 160). En Paraguay son muy escasos los estudios sobre la diversidad genética del DENV-1 (54, 139).

Las cepas de DENV-1 aisladas en nuestro estudio se agruparon dentro del genotipo V, de acuerdo con el genotipo circulante en las Américas, pero formando un grupo diferente de aquellos detectados previamente en el país, sugiriendo la introducción de un nuevo grupo, reemplazando los detectados en años anteriores (48, 50, 54, 139). Se mostró que las cepas paraguayas aisladas en diferentes años se distribuyeron en tres grupos filogenéticos distintos, los mismos fueron denominados I, II y III (Figura 12).

Se observó que las cepas de DENV-1 caracterizadas en este estudio se relacionaron filogenéticamente con dos cepas de Brasil, aisladas en 2010 y 2011, formando el grupo I. Cabe resaltar que en el 2010 se produjo la mayor epidemia de dengue en Brasil, en la cual se

registraron 673 muertes y fue causada predominantemente por DENV-1 (161). Es interesante destacar que la cepa 15_2010/BR/RJ/2010 fue aislada de un residente de Río de Janeiro que había viajado al estado de Mato Grosso do Sul, región oeste medio (83). Considerando que dicho estado brasilero limita al sur y sur oeste con territorio paraguayo, sumado al hecho de que existe un gran movimiento de personas entre ambos países en esta zona, este hallazgo podría sugerir la introducción de estos virus al Paraguay ya en el 2010. Sin embargo, son necesarios más datos para confirmar dicha hipótesis.

También se observó que el grupo I se encontró relacionado filogenéticamente con cepas aisladas entre 2007-2010 en Haití, Rca. Dominicana y Puerto Rico sugiriendo una relación con cepas del Caribe. Otros autores mostraron que las cepas brasileras, incluidas en el grupo I en nuestro estudio, se encontraban relacionadas con cepas aisladas en Colombia, Venezuela y México entre 2007-2008 (83).

La existencia de distintos linajes de DENV-1 fue reportada en varios estudios, así en Brasil, se identificó la circulación de múltiples linajes de DENV-1 causantes de diferentes epidemias en Río de Janeiro (83), otro estudio que incluyó cepas de DENV-1 aisladas entre 1994-2008 en dicho país mostró una segregación independiente de diferentes linajes a lo largo de los años y se demostró el fenómeno de reemplazo de linajes (162). Además, el trabajo conducido por Drumond y col. demostró que la dinámica de DENV-1 en Brasil está caracterizada por introducción, movimiento, evolución local y reemplazo de linajes (163). También en estos estudios han sugerido que la introducción de nuevas cepas de DENV-1 al vecino país pudo provenir de otros países latinoamericanos debido a la proximidad geográfica, lo que indica que la dinámica de flujo de población alrededor del mundo contribuye a la rápida propagación y la introducción de nuevos linajes de este virus (52, 162, 163).

Por otro lado, se ha descrito la existencia de diferentes linajes de DENV-1 así como el reemplazo de linajes en otros países como Colombia, India, Tailandia, entre otros (48, 82, 84, 160).

Los virus de **DENV-2** son genéticamente los más diversos entre los tipos de DENV (142). La primera gran epidemia de dengue grave en las Américas (Cuba, 1981) fue atribuida a la introducción del DENV-2 perteneciente al genotipo asiático (117). Estudios filogenéticos evidenciaron que el DENV-2 introducido al Brasil a través de Río de Janeiro en 1990, así como en Colombia, Venezuela y México, mostraron un progenitor común con aislados del Sudeste asiático, sugiriendo una dirección de transmisión desde el sudeste de Asia a las Américas (142). Al igual que para DENV-1, aun son muy escasos los estudios filogenéticos de aislados de DENV-2 en nuestro país (140).

El análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-2 llevado a cabo en nuestro trabajo coincidió con los hallazgos mencionados anteriormente en cuanto a la distribución en seis genotipos (42, 57, 58). Las cepas virales de DENV-2 aisladas en nuestro estudio pertenecieron al genotipo Americano/Asiático. Este resultado era esperado ya que dicho genotipo es el que circula en las Américas (57). Las mismas pertenecieron a un grupo distinto de los conformados por cepas aisladas en el país en años anteriores, sugiriendo la introducción de un nuevo grupo reemplazando los ya descritos anteriormente (140). Se mostró que las cepas aisladas en Paraguay en diferentes años se distribuyeron en tres grupos a los cuales los denominamos I, II y III (Figura 14).

El reemplazo de grupos mencionado podría estar asociado a un cambio de tipo de DENV dominante en nuestro país, dado que el DENV-2 fue designado como tal desde que volvió a detectarse en 2010 (138). Este fenómeno ya fue descrito previamente en el país (140). A pesar

de que se precisan más datos para comprobar estas apreciaciones, existen reportes previos de la asociación entre el reemplazo de grupos y el desplazamiento o cambio de tipos predominantes (84, 141, 164, 165).

Además se destacó la relación filogenética estrecha entre cepas paraguayas y cepas brasileras (2007-2010) formando el grupo I, esto indicó que probablemente las cepas circulantes en Paraguay fueron introducidas desde el vecino país. Cabe destacar que en Brasil en el 2007-2008 se produjo una gran epidemia en términos de números de casos y muertes en ese país, se registró una proporción de casos de dengue grave (2.706) que significó más del doble que el mayor número de casos reportados en años anteriores. Por otra parte, más del 53% de los casos fueron en niños menores de 15 años de edad (166-170). Oliveira y col. sugirieron que los DENV-2 responsables de la mencionada epidemia eran genéticamente distintos a los circulantes en una epidemia anterior en 1998, y que su introducción pudo haber contribuido en el perfil de patogenicidad (166). De esta manera, se podría sugerir que probablemente los virus de DENV-2 causantes de la epidemia grave en Brasil fueron introducidos al Paraguay causando casos graves de la enfermedad y registrándose la gran epidemia en el país en 2011. Se podría plantear también que probablemente estos virus ya ingresaron al país en el 2010, pues en ese año se detectó el DENV-2 concomitante con la aparición de casos graves y muertes (135).

Por último, el análisis filogenético mostró que las cepas paraguayas del grupo I se agruparon con un aislado de República Dominicana. Esto coincide con lo publicado por Romano y col., donde mostraron que los virus responsables de las epidemias en Río de Janeiro (2007-2010) se relacionaron estrechamente con aislados provenientes de Martinica, Cuba y República Dominicana sugiriendo una posible re-introducción de DENV-2 del Caribe (171).

Sintetizando, se sugirió que ambos tipos de DENV pudieron haber ingresado al Paraguay desde el Brasil, este ingreso se ve facilitado por el estrecho contacto comercial y turístico existente con el vecino país. Se mostró una relación filogenética entre los aislados en el estudio y virus provenientes del Caribe, esto podría sugerir un probable origen de los virus desde esta región, sin embargo esta relación podría deberse tal vez a un mejor monitoreo y sistema de detección en esta zona; por ello se necesitan más estudios para definir las rutas biológicas de la dispersión del virus. Por otro lado, tanto para los DENV-1 como para los DENV-2 caracterizados en este estudio se observó el mismo fenómeno de reemplazo de grupos. El análisis filogenético mostró que los aislados de DENV en el 2011 en Paraguay se agruparon de manera independiente de los virus detectados en el país en años anteriores, sugiriendo nuevas introducciones de fuera del país. Cabe destacar que estudios previos reportaron que la sustitución o introducción de un nuevo tipo, genotipo o linaje de DENV normalmente se relaciona con un aumento en la incidencia y frecuentemente, por la ocurrencia de brotes importantes (83, 85, 86). Además, análisis longitudinales han demostrado que linajes individuales o grupos/clados enteros frecuentemente surgen, persisten por un periodo de tiempo determinado y luego se reducen drásticamente en términos de frecuencia incluso experimentando la extinción, sustituyéndose a veces por un nuevo grupo (84).

A pesar de no contar con la caracterización de todas las cepas causantes de epidemias anteriores en Paraguay, el reemplazo de grupos o linajes dentro de los genotipos de DENV a través del tiempo ya fue demostrada en varios estudios; así un linaje puede aparecer, persistir por un período de tiempo y luego desaparecer (48, 162). Estos eventos de reemplazos intragenotípicos podrían deberse a que ciertos grupos presentan ventajas sobre los predecesores,

a causa de factores estocásticos relacionados principalmente a la fluctuación del tamaño y densidad de la población del vector o debido a factores inmunológicos de la población (84).

Estudios evolutivos del DENV han observado que el reemplazo de linajes parece ocurrir más frecuentemente que la persistencia a largo plazo de un linaje (50, 172). A pesar de que su relación como causante de la aparición de epidemias de carácter explosivo no está claro aún, los eventos evolutivos pueden potencialmente desencadenar cambios en la patogenicidad como en las manifestaciones clínicas presentadas por los individuos infectados por el virus (48, 173). Por ello, realizar la caracterización molecular del DENV en el marco de la vigilancia epidemiológica es de suma importancia, por otro lado, también son necesarios estudios filogeográficos de las cepas circulantes en el país a fin de definir las posibles rutas de entrada del virus al territorio nacional (83, 162).

6. CONCLUSIONES

- Se detectó la circulación de DENV-1 y DENV-2 en Asunción y área metropolitana entre febrero y junio del 2011.
- El análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de los virus aislados mostró que los DENV-1 pertenecían al genotipo V y los DENV-2 al genotipo Americano/Asiático.
- Los virus aislados de DENV-1 y DENV-2 en el estudio pertenecían a grupos distintos a los conformados por aislados en años anteriores en el país, sugiriendo la introducción de nuevos grupos, produciéndose un reemplazo de grupos.
- Se sugirió que la introducción de los DENV-1 y DENV-2 caracterizados en el estudio pudo haber sido a través del Brasil. Se mostró una relación filogenética entre los virus aislados en el estudio y virus provenientes del Caribe.

7. PERSPECTIVAS

A fin de comparar los resultados obtenidos utilizando el método de NJ se incluirán análisis con otros métodos como ser los de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

Dando continuidad a la caracterización molecular de los DENV aislados, se analizarán con detalle las sustituciones nucleotídicas observadas en las secuencias obtenidas (transiciones/transversiones, relación entre sustituciones no sinónimas y sinónimas dN/dS). Así también, se analizarán las sustituciones de aminoácidos (conservativas/no conservativas) examinando la localización de las mismas en la proteína en cuanto a dominios y estructura terciaria se refiere, se comparará con cepas más antiguas aisladas en Paraguay y otras cepas seleccionadas del *GenBank*. Si bien en nuestro estudio no se pudo establecer asociaciones con la gravedad de la enfermedad ni con la sintomatología clínica, resultará interesante analizar la composición de aminoácidos de las cepas aisladas y comparar con lo reportado en la literatura en cuanto a posibles asociaciones entre sustituciones de aminoácidos y patogénesis de la enfermedad. En cuanto a esto, estudios previos han descripto que la presencia de Asparagina (N) en la posición E₃₉₀ de DENV-2 ha sido caracterizada como probable determinante genético desencadenador de dengue grave y ha sido relacionada con la mayor activación de macrófagos y exacerbación de la respuesta inmune (174, 175).

A fin de contribuir con más datos acerca de la variabilidad a nivel del genoma completo y tratar de comprender mejor los procesos evolutivos del DENV, se seleccionarán ciertas cepas de DENV-1 y DENV-2 aisladas en nuestro estudio para ser secuenciadas completamente.

Por último, teniendo en cuenta que recientemente se detectó el DENV-4 en el país, sería interesante evaluar el impacto de la circulación de este nuevo tipo de DENV en Paraguay. Si bien el análisis filogenético realizado en este estudio demostró la circulación de genotipos de DENV-1 y DENV-2 que ya fueron detectados en el país, también se mostró la introducción de

nuevos grupos reemplazando los descriptos en años anteriores. Dado que la introducción de nuevos tipos, genotipos o grupos podría estar relacionada con un aumento en la incidencia y la ocurrencia de brotes importantes, se destaca la importancia de continuar con la vigilancia del DENV en el país mediante estudios de epidemiología molecular del virus (83, 86). En ese contexto, este estudio podría extenderse e incluir a otros centros hospitalarios, idealmente hospitales regionales representantes de distintos puntos del país para así evaluar la situación desde un punto de vista más global e intentar inferir la dinámica espacio-temporal de la distribución del virus teniendo en cuenta la procedencia de los pacientes. Así también se contemplará la inclusión de muestras de diferentes casos clínicos de la enfermedad en especial casos graves.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Guzman MG, Kourí G, Bravo J. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. 1999;51(1):5-13.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jan;2(1):33-42.
3. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003 May;27(1):1-13.
4. WHO. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Revised and expanded edition New Delhi, India: Regional Office for South-East Asia.; 2011. p. 197.
5. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
6. Rush AB. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. In: Hall P, editor. *Medical Inquiries and Observations*. Philadelphia 1789. p. 104-17.
7. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever; its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* New York: CAB International Press; 1997. p. 1–22.
8. WHO. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: WHO; 1997.
9. WHO. Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever. Geneva: WHO (Southeast Asian and Western Pacific Regional Offices); 1975.
10. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New ed. Geneva: WHO; 2009.
11. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. France: World Health Organization; 2009.
12. World Health Organization. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. Revised and expanded edition 2011.
13. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, Daramola OA, Dung NM, Loan HT, et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with Dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35(3):277-85.

14. Tuiskunen A, Wahlstrom M, Bergstrom J, Buchy P, Leparc-Goffart I, Lundkvist A. Phenotypic characterization of patient dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. *Virology*. 2011;8:398.
15. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul;9(7):800-9.
16. Mota J, Rico-Hesse R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *J Virol*. 2009 Sep;83(17):8638-45.
17. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol*. 2002 Jul 1;156(1):40-51.
18. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970 Apr;42(5):311-28.
19. Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis*. 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S830-9.
20. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. 2006 Apr 15;193(8):1078-88.
21. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*. 2010 Apr 12;207(4):793-806.
22. Acosta Bas C, Gómez Cordero I, Habana C. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed*. 2005;16(1):113-37.
23. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002 Feb;10(2):100-3.
24. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.
25. Iacono-Connors LC, Schmaljohn CS. Cloning and sequence analysis of the genes encoding the nonstructural proteins of Langkat virus and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology*. 1992 Jun;188(2):875-80.

26. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):1922-7.
27. Fulop L, Barrett AD, Phillipotts R, Martin K, Leslie D, Titball RW. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. *J Virol Methods.* 1993 Oct;44(2-3):179-88.
28. de Moraes Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol.* 2005 Feb;43(2):696-702.
29. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1295-304.
30. Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods.* 2006 Dec;138(1-2):123-30.
31. Baleotti FG, Moreli ML, Figueiredo LT. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Apr;98(3):379-82.
32. Regato M, Recarey R, Moratorio G, de Mora D, Garcia-Aguirre L, Gonzalez M, et al. Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. *Virus Res.* 2008 Mar;132(1-2):197-200.
33. Klungthong C, Putnak R, Mammen MP, Li T, Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods.* 2008 Dec;154(1-2):175-81.
34. Mondini A, de Moraes Bronzoni RV, Nunes SH, Chiaravalloti Neto F, Massad E, Alonso WJ, et al. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in Sao Paulo, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(5):e448.
35. Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Engle M, Brien JD, Dowd KA, Williams KL, et al. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. *J Virol.* 2010 Sep;84(18):9227-39.
36. Yu S, Wu A, Basu R, Holbrook MR, Barrett AD, Lee JC. Solution structure and structural dynamics of envelope protein domain III of mosquito- and tick-borne flaviviruses. *Biochemistry.* 2004 Jul 20;43(28):9168-76.

37. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004 Jan 22;427(6972):313-9.
38. Lindenbach B. D., Thiel H.-J., Rice CM. Flaviviridae: the virus and their replication. In: Knipe D. M., M. HP, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, PA.: Lippincott William & Wilkins; 2007. p. 991.
39. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Jun;9(3):327-43.
40. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.
41. Diallo M, Ba Y, Sall AA, Diop OM, Ndione JA, Mondo M, et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg Infect Dis*. 2003 Mar;9(3):362-7.
42. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011 Sep;3(9):1562-608.
43. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul;9(7):532-41.
44. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(5):e646.
45. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):523-40.
46. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990 Feb;174(2):479-93.
47. Holmes EC. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. *J Virol*. 2003 Oct;77(20):11296-8.
48. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol J*. 2010;7:226.
49. Diaz FJ, Black WCt, Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res*. 2006 Aug;37(6):760-73.

50. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*. 2002 Nov 10;303(1):110-9.
51. Teoh BT, Sam SS, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Isolation of ancestral sylvatic dengue virus type 1, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2010 Nov;16(11):1783-5.
52. Raghwani J, Rambaut A, Holmes EC, Hang VT, Hien TT, Farrar J, et al. Endemic dengue associated with the co-circulation of multiple viral lineages and localized density-dependent transmission. *PLoS Pathog*. 2011 Jun;7(6):e1002064.
53. Imrie A, Roche C, Zhao Z, Bennett S, Laille M, Effler P, et al. Homology of complete genome sequences for dengue virus type-1, from dengue-fever- and dengue-haemorrhagic-fever-associated epidemics in Hawaii and French Polynesia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010 Apr;104(3):225-35.
54. Aviles G, Meissner J, Mantovani R, St Jeor S. Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina. *Virus Res*. 2003 Dec;98(1):75-82.
55. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993 Nov;197(1):216-24.
56. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998 January 1, 1998;58(1):96-101.
57. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002 Jun 20;298(1):63-72.
58. Salda LT, Parquet MD, Matias RR, Natividad FF, Kobayashi N, Morita K. Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: genotype shift and local evolution. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Oct;73(4):796-802.
59. Cardoso J, Ooi MH, Tio PH, Perera D, Holmes EC, Bibi K, et al. Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):e423.
60. Vasilakis N, Tesh RB, Weaver SC. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar;14(3):502-4.
61. Franco L, Palacios G, Martinez JA, Vazquez A, Savji N, De Ory F, et al. First report of sylvatic DENV-2-associated dengue hemorrhagic fever in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5(8):e1251.

62. Amarilla AA, de Almeida FT, Jorge DM, Alfonso HL, de Castro-Jorge LA, Nogueira NA, et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virology*. 2009;6:113.
63. Araujo JM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Zanotto PM, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):716-25.
64. Podder G, Breiman RF, Azim T, Thu HM, Velathanthiri N, Mai le Q, et al. Origin of dengue type 3 viruses associated with the dengue outbreak in Dhaka, Bangladesh, in 2000 and 2001. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Feb;74(2):263-5.
65. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol*. 2003 Jun;84(Pt 6):1569-75.
66. Aquino VH, Anatriello E, Goncalves PF, EV DAS, Vasconcelos PF, Vieira DS, et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):710-5.
67. Ospina MC, Diaz FJ, Osorio JE. Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Sep;83(3):672-8.
68. Villabona-Arenas CJ, Miranda-Esquivel DR, Jimenez RE. Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007. *Trop Med Int Health*. 2009 Oct;14(10):1241-50.
69. Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol*. 2008 Jul;82(13):6631-43.
70. Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virology*. 2005;2:72.
71. Sharma S, Dash PK, Agarwal S, Shukla J, Parida MM, Rao PV. Comparative complete genome analysis of dengue virus type 3 circulating in India between 2003 and 2008. *J Gen Virol*. 2011 Jul;92(Pt 7):1595-600.
72. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 2002 Sep 15;301(1):148-56.

73. Araujo JM, Bello G, Schatzmayr HG, Santos FB, Nogueira RM. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May;104(3):526-9.
74. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008;72:1-76.
75. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*. 2004 Nov 10;329(1):168-79.
76. Villabona-Arenas CJ, Zanotto PM. Evolutionary history of Dengue virus type 4: insights into genotype phylodynamics. *Infect Genet Evol*. 2011 Jul;11(5):878-85.
77. de Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):e390.
78. Figueiredo RM, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourao MP, et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):667-9.
79. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000 Apr;74(7):3227-34.
80. Alfonso HL, Amarilla AA, Goncalves PF, Barros MT, Almeida FT, Silva TR, et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virol J*. 2012 Jun 20;9(1):124.
81. Myat Thu H, Lowry K, Jiang L, Hlaing T, Holmes EC, Aaskov J. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology*. 2005 Jun 5;336(2):163-72.
82. Kukreti H, Dash PK, Parida M, Chaudhary A, Saxena P, Rautela RS, et al. Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. *Virol J*. 2009;6:1.
83. dos Santos F, Nogueira F, Castro M, Nunes P, de Filippis AM, Faria N, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology Journal*. 2011;8(1):387.
84. Zhang C, Mammen MP, Jr., Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol*. 2005 Dec;79(24):15123-30.

85. Lee KS, Lai YL, Lo S, Barkham T, Aw P, Ooi PL, et al. Dengue virus surveillance for early warning, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2010 May;16(5):847-9.
86. Lee KS, Lo S, Tan SS, Chua R, Tan LK, Xu H, et al. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infect Genet Evol.* 2012 Jan;12(1):77-85.
87. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 2004 Mar;8(2):69-80.
88. Teles FR, Prazeres DM, Lima-Filho JL. Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol.* 2005 Sep-Oct;15(5):287-302.
89. 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 Negl Trop Dis.* 2010;4(8).
90. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods.* 1991 Jun;33(1-2):101-13.
91. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978 Sep;40(3):531-44.
92. Crespo MP. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colombia Med.* 2000;31(3):135-50.
93. Acosta Bas C. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed.* 2005;16(2):113-37.
94. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(1):e360.
95. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(8):e280.
96. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):376-81.

97. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51.
98. Deubel V, Laille M, Hugnot JP, Chungue E, Guesdon JL, Drouet MT, et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods.* 1990 Oct;30(1):41-54.
99. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 Nov;3(6):621-7.
100. Pankhong P, Siriprasertkul W, Patpoparn S, Srisuphanunt M, Rojanapremsuk J, Sithiprasasna R, et al. Molecular serotyping of dengue viruses in field-caught *Aedes* mosquitoes by in-house RNA extraction/RT-PCR reagent kits. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002;33 Suppl 3:139-44.
101. Sanchez-Seco MP, Rosario D, Hernandez L, Domingo C, Valdes K, Guzman MG, et al. Detection and subtyping of dengue 1-4 and yellow fever viruses by means of a multiplex RT-nested-PCR using degenerated primers. *Trop Med Int Health.* 2006 Sep;11(9):1432-41.
102. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998 September 1, 1998;36(9):2634-9.
103. Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 2002 Dec;25 Suppl 3:S3-12.
104. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):4977-83.
105. Warrilow D, Northill JA, Pyke A, Smith GA. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *J Med Virol.* 2002 Apr;66(4):524-8.
106. Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* 2009;6:10.
107. Lai Y-L, Chung Y-K, Tan H-C, Yap H-F, Yap G, Ooi E-E, et al. Cost effective real time RT-PCR to screen for Dengue followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007 January 10, 2007.
108. dos Santos HW, Poloni TR, Souza KP, Muller VD, Tremeschin F, Nali LC, et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1426-33.

109. Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *N Am J Med Sci*. 2011 Oct;3(10):478-85.
110. Runge-Ranzinger S, Horstick O, Marx M, Kroeger A. What does dengue disease surveillance contribute to predicting and detecting outbreaks and describing trends? *Trop Med Int Health*. 2008 Aug;13(8):1022-41.
111. Chanama S, Anantapreecha S, A An, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol*. 2004 Nov;31(3):185-9.
112. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol*. 2005 Jun;33(2):132-7.
113. 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. *Int J Infect Dis*. 2007 May;11(3):256-62.
114. Guzman MG, Vazquez S, Kouri G. Dengue: where are we today? *Malays J Med Sci*. 2009 Jul;16(3):4-11.
115. Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis*. 2009 Nov;9(11):678-87.
116. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7229-41.
117. Guzman MG. Thirty years after the Cuban hemorrhagic dengue epidemic of 1981. *MEDICC Rev*. 2012 Apr;14(2):46-51.
118. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Jan;82(1):128-35.
119. Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol Bull*. 1989;10(1):1-8.
120. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50(3-4):161-9.

121. Anderson CR, Downs WG, Hill AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science*. 1956 Aug 3;124(3214):224-5.
122. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*. 1989;67(4):375-80.
123. Gubler DJ. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore*. 1998 Mar;27(2):227-34.
124. OPS. Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: Guías para su Prevención y Control 1995.
125. OPS. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas: An Overview of the Problem. *Epidemiol Bull*. 1992;13:9-10.
126. Morens DM, Rigau-Perez JG, Lopez-Correa RH, Moore CG, Ruiz-Tiben EE, Sather GE, et al. Dengue in Puerto Rico, 1977: public health response to characterize and control an epidemic of multiple serotypes. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Jan;35(1):197-211.
127. Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. [Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994]. *Rev Cubana Med Trop*. 1996;48(2):114-7.
128. Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Oct;96(7):925-6.
129. Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, Mueller BA, et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2012 Jun;29(6):1533-43.
130. PAHO. Pan American Health Organization. Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) 1995-2010: Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue.htm>.
131. MSPBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. 1999 Nov;5(17):1-8.
132. MSPBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay 2000 Jun;6(19):1-8.
133. OPS. Dengue Outbreak in Paraguay, 2007. EID Updates: Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Region of the Americas [serial on the Internet]. 2007; 4(1): Available from: <http://www.paho.org/English/ad/dpc/cd/eid-eer-2007-01-29.htm>.

134. OPS. Dengue Outbreak Continues to Subside in Paraguay. EID Updates:Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Region of the Americas [serial on the Internet]. 2007; 4(8): Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2007.htm>.
135. MSPyBS. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Boletín Epidemiológico Semanal [serial on the Internet]. 2011; 49: Available from: http://www.vigisalud.gov.py/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=12:boletin-epidemiologico-2011&Itemid=128.
136. MSPyBS. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Boletín Epidemiológico Semanal [serial on the Internet]. 2012; 24: Available from: http://www.vigisalud.gov.py/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=20:boletin-epidemiologico-ano-2012&Itemid=128.
137. MSPyBS. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Boletín Epidemiológico Semanal [serial on the Internet]. 2012; 32: Available from: http://www.vigisalud.gov.py/index.php?option=com_phocadownload&view=file&id=219&Itemid=129.
138. MSPyBS. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Boletín Epidemiológico Semanal [serial on the Internet]. 2011; 24: Available from: http://www.vigisalud.gov.py/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=20:boletin-epidemiologico-ano-2012&Itemid=128.
139. Aviles G, Rowe J, Meissner J, Manzur Caffarena JC, Enria D, St Jeor S. Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay. Arch Virol. 2002 Nov;147(11):2075-87.
140. Aquino JD, Tang WF, Ishii R, Ono T, Eshita Y, Aono H, et al. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. Virus Res. 2008 Nov;137(2):266-70.
141. Thu HM, Lowry K, Myint TT, Shwe TN, Han AM, Khin KK, et al. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. Emerg Infect Dis. 2004 Apr;10(4):593-7.
142. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology. 1997 Apr 14;230(2):244-51.
143. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Adv Virus Res. 2003;59:315-41.

144. Barrero PR, Mistchenko AS. Genetic analysis of dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res.* 2008 Jul;135(1):83-8.
145. Laille M, Roche C. Comparison of dengue-1 virus envelope glycoprotein gene sequences from French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Oct;71(4):478-84.
146. Johnson AJ, Guirakhoo F, Roehrig JT. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology.* 1994 Sep;203(2):241-9.
147. Christenbury JG, Aw PP, Ong SH, Schreiber MJ, Chow A, Gubler DJ, et al. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. *J Virol Methods.* 2010 Oct;169(1):202-6.
148. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
149. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*1999. p. 95-8.
150. Xia X, Xie Z. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity.* 2001 July 1, 2001;92(4):371-3.
151. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.
152. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution.* 2008 July 1, 2008;25(7):1253-6.
153. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science.* 2004 Jan 16;303(5656):327-32.
154. Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):2-9.
155. Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanaraj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1213-21.

156. Poloni TR. Detection and typing of dengue virus by real time RT-PCR assays [Master]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2009.
157. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 May;56(5):566-72.
158. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Sep;61(3):412-9.
159. Chungue E, Cassar O, Drouet MT, Guzman MG, Laille M, Rosen L, et al. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 1995 Jul;76 (Pt 7):1877-84.
160. Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascon J, et al. Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1519-29.
161. PAHO. Pan American Health Organization. Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2010: Available from: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=13075&Itemid=.
162. Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo Dde V, Ramos RT, Medeiros DB, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Sep;107(6):805-12.
163. Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol.* 2012 Jul 10.
164. Adams B, Holmes EC, Zhang C, Mammen MP, Jr., Nimmannitya S, Kalayanarooj S, et al. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 19;103(38):14234-9.
165. Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Ginting AP, Sary DD, et al. Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. *PLoS One.* 2011;6(11):e27322.
166. Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Jr., Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis.* [carta al editor]. 2010 Mar;16(3):576-8.

167. Ministério. de Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Janeiro a Dezembro 2007: Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf.
168. Ministério. de Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Janeiro a Dezembro 2008: Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf . .
169. Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1663.
170. Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7-18.
171. Romano CM, de Matos AM, Araujo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One*. 2010;5(7):e11811.
172. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol*. 2003 Oct;20(10):1650-8.
173. Barcelos Figueiredo L, Batista Cecilio A, Portela Ferreira G, Paiva Drumond B, Germano de Oliveira J, Bonjardim CA, et al. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):314-6.
174. Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Nov;65(5):427-34.
175. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4738-47.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ficha clínica-epidemiológica para el registro de los datos de los pacientes con sospecha de dengue

Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
Laboratorio Central de Salud Pública
DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA

CASO N°.....

FICHA DE INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA
DENGUE

DATOS DEL NOTIFICANTE

Nombre: Fecha de notificación:...../...../.....
 Establecimiento de Salud:..... Distrito:.....
 Región Sanitaria:

DATOS DEL PACIENTE

Nombre y Apellido: Edad:
 Sexo: M F
 Domicilio Permanente: Barrio o Cñia:
 Distrito:..... Región Sanitaria N°
 Referencia para ubicar el domicilio:
 Urbano: Rural: Teléfono:.....

DATOS CLÍNICOS

Completar con SI o No Fecha de Consulta/...../.....
 Fiebre Cefalea Dolor Retroocular Mialgias Artralgia Postración
 Exantema Dolor Abdominal Petequias Epistaxis Gingivorragia Hepatomegalia
 Hemorragias Diversas Náuseas/Vómitos Ascitis Depparme Pleural Estado de Shock (Ext. Frías/Sudoración)
 Fecha de inicio de fiebre:/...../..... Fecha de término de fiebre:...../...../.....
 Pulso:..... Presión Arterial: mmHg Hospitalización
 Nombre del Hospital: Defunción:..... Fecha/...../.....
 Distrito:.....

DATOS EPIDEMIÓLOGOS:

Viajó dentro de los 8 a 15 días antes de la fiebre? SI NO
 Adónde? especifique País: Distrito Municipio:
 Fecha de viaje:/...../..... Fecha de retorno:/...../..... Tuvo dengue?: SI NO
 Fue vacunado contra la Fiebre Amarilla? SI NO Fecha:...../...../.....

DATOS DE LABORATORIO

PRUEBAS Prueba Del Iazo: Positiva Negativa No Realizada	LABORATORIO: Hematocrito%/...../..... Plaquetas:/...../..... Hematocrito%/...../..... Plaquetas:/...../.....
Muestra de Sangre (Test de elisa u Otros) Fecha de Toma/...../..... Fecha de Recepción/...../..... Fecha de Resultado/...../.....	Lab Central Aislamientos del Virus Serotipo Positivo 1 Serotipo I Negativo 2 Serotipo II Fecha de Resultado 3 Serotipo III 4 Serotipo IV

DIAGNÓSTICO FINAL:

CASO Importado <input type="checkbox"/> Autóctono <input type="checkbox"/> Ignorado <input type="checkbox"/>	CLASIFICACIÓN Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	CRITERIO Laboratorio <input type="checkbox"/> Nexo Epidemiológico <input type="checkbox"/> Clínico <input type="checkbox"/>	DIAGNÓSTICO FINAL Dengue Clásico <input type="checkbox"/> Dengue Hemorrágico <input type="checkbox"/> Dengue Hemorrágico con Shock <input type="checkbox"/>
--	--	---	---

NOTIFICACIÓN INMEDIATA: A las regiones Sanitarias correspondientes y/o al TELEFAX: (021) 208 217
 Dirección General de Enfermedades Transmisibles.
OBSERVACIÓN: COMPLETAR TODOS LOS DATOS DISPONIBLES!!!!

Anexo 2. Oligonucleótidos (*primers*) utilizados para detección, amplificación y secuenciación de regiones específicas del DENV

<i>Reacción</i>	<i>Primers</i>	<i>Secuencia 5'- 3'</i>	<i>Ref.</i>
RT-PCR en tiempo real (región 5'UTR) para detección	5' UTR-S	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA	<i>Aquino y col., 2006</i>
	5'UTR-C	CGCGTTTCAGCATATTGAAAG	
RT PCR (región parcial del gen de proteína NS5) para tipificación	FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	<i>de Morais Bronzoni y col., 2005</i>
	nDEN-1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	
	nDEN-2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC	
	nDEN-3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	
	nDEN-4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	
RT PCR (gen de proteína E) para tipificación y secuenciación*	d1s3*	AAACGTTCCGTSGCACTGGC	<i>Christenbury y col., 2010</i>
	d1a17*	CCAATGGCYGCTGAYAGTCT	
	d1a18*	CAAGTCCCATCAATATAGCTGC	
	d2a19*	GGCGRCCTAAGACATRTCTTTT	
	ES(D2)B*	GGCATAACCCATAGGAACGAC	No publicado
	EC(D2)B*	AGGGGATTCTGGTTGGAACCTT	
	ES(D3)	GCCCTATTTCTTGCCCATTACA	<i>Aquino y col., 2006</i>
	EC(D3)	CCGCACACTCCATTCTCCCAA	

Obs: D= G+A+T; R= A+G S= G+C; Y= C+T

Anexo 3. Base de datos conteniendo las secuencias del gen de la proteína E de las cepas de DENV-1 obtenidas del *GenBank*

Codificación	Origen	Año de aislamiento	Código de acceso	Nombre de la cepa
AR/AF514876/2000	Argentina	2000	AF514876	301arg00
AR/AF514885/2000	Argentina	2000	AF514885	295arg00
AR/AF514889/2000	Argentina	2000	AF514889	297arg00
AR/AY206457/2000	Argentina	2000	AY206457	293arg00
AW/AF425609/1985	Aruba	1985	AF425609	495-1
BR/AF226685/1990	Brasil	1990	AF226685	Den1BR/90
BR/AF425614/1997	Brasil	1997	AF425614	BeH 584526
BR/AF513110/2001	Brasil	2001	AF513110	BR/01-MR
BR/FJ850075/2002	Brasil	2002	FJ850075	DENV-1/BR/BID-V2381/2002
BR/FJ850087/2006	Brasil	2006	FJ850087	DENV-1/BR/BID-V2395/2006
BR/FJ850090/2007	Brasil	2007	FJ850090	DENV-1/BR/BID-V2398/2007
BR/JF804014/2003	Brasil	2003	JF804014	BR/DB001/2003
Br/HQ696614/2010	Brasil	2010	HQ696614	188_2010/BR/RJ/2010
BR/HQ696613/2010	Brasil	2010	HQ696613	20_2010/BR/RJ/2010
BR/HQ026762/2010	Brasil	2010	HQ026762	19_2010/BR/RJ/2010
BR/HQ696612/2010	Brasil	2010	HQ696612	15_2010/BR/RJ/2010
BR/JN122281/2011	Brasil	2011	JN122281	0122_2011/BR/RJ/2011
BR/HQ026761/2009	Brasil	2009	HQ026761	1433_09/BR/RJ/2009
BR/HM043710/2009	Brasil	2009	HM043710	1435/2009RJ
BR/HM043709/2009	Brasil	2009	HM043709	55/2009ES
KH/AF309641	Camboya	1998	AF309641	D1/H/IMTSSA-CAMB/98/658
KH/FJ744702/2006	Camboya	2006	FJ744702	DENV-1/KH/BID-V2003/2006
CH/DQ193572	China	2004	DQ193572	Fj231/04
CI/JF804015/2007	Colombia	2007	JF804015	CI/DB002/2007
CO/AF425616/1985	Colombia	1985	AF425616	INS 347869
CO/AF425617/1996	Colombia	1996	AF425617	INS 371869
CR/AY153756/1993	Costa Rica	1993	AY153756	cesara13
CR/JF804016/2005	Costa Rica	2005	JF804016	CR/DB003/2005
PH/AF425627/1974	Filipinas	1974	AF425627	PRS 228682
GD/AF425618/1977	Grenada	1977	AF425618	CAREC 778156
HA/JF969281/2010	Haití	2010	JF969281	HA/DB066/2010
JM/AF425621/1977	Jamaica	1977	AF425621	PRS 288690
MY/AF425622/1972	Malasia	1972	AF425622	P72-1244
MY/FN825674	Malasia	2005	FN825674	D1/Malaysia/36046/05
CARIBBEAN/D00504	México	1983	D00504	Caribbean 924-1
MX/JQ920432/2010	México	2010	JQ920432	MX/DB088/2010
MM/AF425615/1976	Myanmar	1976	AF425615	PRS 228686
NC/001477	Nauru	1974	NC_001477	WP74
WP/DVU88535/1974	Nauru	1974	DVU88535	West Pac 74

PY/AB111065/1999	Paraguay	1999	AB111065	99-36-1HuNIID
PY/AF514878/2000	Paraguay	2000	AF514878	280par00
PY/AF514883/2000	Paraguay	2000	AF514883	259par00
PE/AF425626/1991	Perú	1991	AF425626	DEI 0151
PR/AY780642/1994	Puerto Rico	1994	AY780642	Puerto Rico/1994
PR/JF804022/2007	Puerto Rico Rca.	2007	JF804022	PR/DB009/2007
DO/JF804017/2007	Dominicana	2007	JF804017	DR/DB004/2007
SC/DQ285561/2004	Seychelles	2004	DQ285561	Seychelles 1480/04
SG/GQ398255/2008	Singapur	2008	GQ398255	DENV-1/SG/07K3640DK1/2008
TH/AF180817/1964	Tailandia	1964	AF180817	16007
TH/AF425629/1963	Tailandia	1963	AF425629	2543-63
TH/AY732482/2001	Tailandia	2001	AY732482	ThD1_0049_01
TH/D10513	Tailandia	1954	D10513	TH-SMAN
TW/AF425628/1987	Taiwan	1987	AF425628	765101
VE/AF425632/1995	Venezuela	1995	AF425632	6222
VE/AF425638/1995	Venezuela	1995	AF425638	5736

Anexo 4. Base de datos conteniendo las secuencias del gen de la proteína E de las cepas de DENV-2 obtenidas del *GenBank*

Codificación	Origen	Año de aislamiento	Código de acceso	Nombre de la cepa
BR/L10041/1990	Brasil	1990	L10041	40247
BR/AY577430/1995	Brasil	1995	AY577430	49255
BR/GQ368173/1998	Brasil	1998	GQ368173	1998/BR/63444
BR/GQ368159/1998	Brasil	1998	GQ368159	1998/BR/63428
BR/JF804028/2006	Brasil	2006	JF804028	BR/DB015/2006
BR/GQ368169/2008	Brasil	2008	GQ368169	2008/BR/305
BR/GQ368176/2008	Brasil	2008	GQ368176	2008/BR/T1
BR/GQ368166/2008	Brasil	2008	GQ368166	2008/BR/246
BR/GQ368172/2008	Brasil	2008	GQ368172	2008/BR/337
BR/GQ368164/2007	Brasil	2007	GQ368164	2007/BR/88034
BR/GQ368162/2007	Brasil	2007	GQ368162	2007/BR/87183
BR/GQ368175/2008	Brasil	2008	GQ368175	2008/BR/T2
BR/GQ368170/2008	Brasil	2008	GQ368170	2008/BR/312
BR/GQ368171/2008	Brasil	2008	GQ368171	2008/BR/316
BR/JQ710658/2010	Brasil	2010	JQ710658	692/2010/BR/RJ/2010
BR/HQ012532/2010	Brasil	2010	HQ012532	BR0199/RJ/2010
BR/HQ012531/2010	Brasil	2010	HQ012531	BR0023/RJ/2010
CN/AF204178/1987	China	1987	AF204178	43
CI/EF105383/1980	Costa de Marfil	1980	EF105383	Dak Ar A1247
CR/JF804030/2003	Costa Rica	2003	JF804030	CR/DB017/2003
PH/AF295694	Filipinas	1996	AF295694	BRL 008
PH/L10045/1983	Filipinas	1983	L10045	2088
GT/GU586492/2007	Guatemala	2007	GU586492	F07-030
HN/GU586122/2007	Honduras	2007	GU586122	F07-073
HN/GU586123/2007	Honduras	2007	GU586123	F07-075
MX/JF804035/2002	Mexico	2002	JF804035	MX/DB022/2002
MX/DQ341195/1983	México	1983	DQ341195	1421/MEXICO/83
MX/DQ341196/1994	México	1994	DQ341196	3315/QUINTANA ROO-MX/94
NI/DQ341201/1999	Nicaragua	1999	DQ341201	541/NICARAGUA/99
NG/DQ341197/1966	Nigeria	1966	DQ341197	IBH11208/NIGERIA/66
GN/EF105378/1981	Nueva Guinea	1981	EF105378	PM33974
NG/AF038403	Nueva Guinea		AF038403	New Guinea C
PY/EU045311/2001	Paraguay	2001	EU045311	D2PY-04/01
PY/EU045312/2005	Paraguay	2005	EU045312	D2PY-21/05
PY/EU045313/2005	Paraguay	2005	EU045313	D2PY-22/05

PE/AY079423/2001	Perú	2001	AY079423	Sullana-Peru 6658-01
PE/AY079424/2001	Perú	2001	AY079424	Sullana-Peru 6663-01
PE/AY577439/1996	Perú	1996	AY577439	IQT2133
PE/DQ917242/1995	Perú	1995	DQ917242	IQT-1950
PR/AY484601/1986	Puerto Rico	1986	AY484601	PR1986B
PR/AY484603/1988	Puerto Rico	1988	AY484603	PR1988B
PR/AY484599/1998	Puerto Rico	1998	AY484599	PR1998B
PR/JQ013408/2007	Puerto Rico	2007	JQ013408	PR/DB071/2007
PR/JF804036/2007	Puerto Rico	2007	JF804036	PR/DB023/2007
PR/AY484600/1994	Puerto Rico	1994	AY484600	PR1994A
PR/DQ917243/1977	Puerto Rico	1977	DQ917243	1328
PR/AF264054/1964	Puerto Rico	1964	AF264054	PR152
PR/GQ868600/1969	Puerto Rico	1969	GQ868600	DENV-2/PR/BID-V3367/1969
DO/JF804031/2003	Rca. Dominicana	2003	JF804031	DR/DB018/2003
SN/EF105384/1970	Senegal	1970	EF105384	Dak HD 10674
TH/DQ181886/1993	Tailandia	1993	DQ181886	ThD2_K0304_93
TH/DQ181901/1996	Tailandia	1996	DQ181901	ThD2_K0035_96
TH/DQ181828/1980	Tailandia	1980	DQ181828	ThD2_0158_80
TH/GQ868591/1964	Tailandia	1964	GQ868591	DENV-2/TH/BID-V3357/1964
VE/GQ868540/1990	Venezuela	1990	GQ868540	DENV-2/VE/BID-V3496/1990
VE/AF363089	Venezuela	1998	AF363089	LARD2891
VE/AY577434	Venezuela	1996	AY577434	15957
VE/AF363081	Venezuela	1997	AF363081	LARD1910
VE/AF363083/1996	Venezuela	1996	AF363083	LARD1996
VE/AY577432	Venezuela		AY577432	102091
DQ341200/1988		1988	DQ341200	620/BORNEO/88