

ARTICULO

Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007

Daríá Elena Camacho¹, Elizabeth Ferrer¹, Francisco Rodríguez-Henríquez¹, Gloria Sierra¹, Irene Bosch², Diane Schmidt², Leticia Franco³, María José Malo⁴, Tadeusz J. Kochel³, Antonio Tenorio⁴ y Guillermo Comach¹

¹Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (LARDIDEV/BIOMED-UC). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo (Sede Aragua). Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

²Center for Infectious Disease and Vaccine Research, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, E.U.A

³ U.S. Naval Medical Research Center Detachment (NMRCD) Lima, Peru

⁴Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Majadahonda-Madrid, España

Correspondencia: G. Comach.

E-mail: gcomach@yahoo.com,
gcomach@cantv.net,
gcomach@gmail.com

RESUMEN

Desde la emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) en 1989, Virus Dengue-1 (DENV-1) ha sido el serotipo prevalente en la mayoría de los brotes epidémicos ocurridos en el estado Aragua, Venezuela. De igual manera, durante estos brotes epidémicos, el DENV-1 ha sido detectado tanto en pacientes con fiebre de dengue (FD) como con FHD. En este estudio se genotipificaron 43 cepas de DENV-1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. El análisis filogenético determinó que los aislados virales de Aragua se agruparon dentro del genotipo V, junto con otros virus detectados en Argentina, Brasil, Nicaragua, Guyana Francesa y Puerto Rico. Así mismo, el análisis sugiere que los DENV-1 de Aragua segregaron en dos clados: uno constituido por virus que circularon en los años 1997 y 1998 – y quizás antes –, y otro conformado por virus que han circulado mayoritariamente entre 1998 - 2007 y que reemplazó al otro clado. Ambos clados pueden ser distinguidos inequívocamente por cuatro sustituciones de aminoácidos (aa) en las posiciones E-297, NS1-146, NS2B-70 y NS4B-17. La secuenciación y el análisis filogenético del segmento unión

E/NS1, confirmó la utilidad de este enfoque para la genotipificación del DENV-1. Las manifestaciones clínicas de los pacientes infectados con los DENV-1, genotipo V, de Aragua, indican que dicho virus posee el potencial para causar todas las formas clínicas de la enfermedad, e incluso la muerte. El análisis filogenético de los DENV-1 aislados en el estado Aragua durante 1997 – 2007 fue determinante para conocer la variabilidad genética y el impacto epidemiológico de los virus circulantes en los brotes epidémicos ocurridos en dicho período.

Palabras clave: Dengue, DENV-1, genotipos, secuenciación

ABSTRACT

Genotyping of dengue virus type 1 circulating in Aragua during the 1997 – 2007 period

Since the emergence of dengue hemorrhagic fever (DHF) in 1989, DENV-1 has been the prevalent serotype in the majority of the outbreaks occurred in Aragua state, Venezuela. Likewise, during these outbreaks, DENV-1 has been isolated from patients with dengue fever (DF) as well as DHF. In this study, we have genotyped 43 DENV-1 strains which circulated during the 1997 – 2007 period. The phylogenetic analysis determined that the Aragua viral isolates grouped within genotype V, along with viruses detected in Argentina, Brazil, Nicaragua, French Guyana and Puerto Rico. Likewise, the analysis suggests that the Aragua's DENV-1 segregated in two clades: one composed by virus that circulated in 1997 and 1998 - and perhaps before - and another which contained virus that have circulated mainly between 1998 and 2007, and that has replaced the other clade. Both clades can be distinguished unmistakably by aminoacid (aa) substitutions at positions E-297, NS1-146, NS2B-70 and NS4B-17. The sequencing and phylogenetic analysis of the short E/NS1 junction segment confirmed the value of this approach for DENV-1 genotyping. The clinical manifestations of the patients infected with the Aragua's DENV-1, genotype V, indicated that this genotype has the potential of producing all clinical forms of dengue, including death. The phylogenetic analysis of DENV-1 isolated in Aragua state during 1997 - 2007 was determinant to know the genetic variability and the epidemiological impact of the circulating viruses in the outbreaks which occurred during that period.

Key words: dengue virus, genotype, sequences

INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por cualquiera de los serotipos del virus Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) representan la enfermedad transmitida por mosquitos a humanos más importante en términos de morbi-mortalidad (1). Clínicamente, el dengue puede cursar de forma asintomática, o de forma sintomática como la Fiebre de Dengue (FD), que en una minoría de casos progresa a la forma severa de Fiebre Hemorrágica de Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD). El DENV es endémico en más de 100 países, con un registro de 50 millones de infectados cada año, incluyendo 500.000 casos de FHD/SCD que requieren hospitalización (2).

En muchos países de Asia y América Latina, las epidemias de FD han sido gradualmente desplazadas por las de FHD/SCD. Así, por ejemplo, se observa que luego de la primera epidemia de FHD/SCD del continente Americano ocurrida en 1981 en Cuba (3), la misma se extiende a Venezuela a finales de 1989 produciendo más de 6000 casos con 73 fallecidos (4). Desde 1990 hasta 1995, se han documentado más de 26.000 casos de FHD/SCD en las Américas y cerca de 5.400 en Venezuela (5) Durante la epidemia de dengue de Venezuela en 1989 - 1990 se aislaron los serotipos DENV-1 y DENV-2, sin embargo fue este último el que se aisló con más frecuencia en los casos de FHD/SCD. Las investigaciones de la variabilidad genética de los DENV circulantes en Venezuela entre 1987 y 1995 sugirieron que la emergencia de las epidemias de FHD/SCD estuvieron asociadas a la

introducción de DENV-2 originario del Sudeste Asiático (genotipo Asiático), el cual desplazo gradualmente al DENV-2 autóctono (genotipo Americano) que había sido reportado como causante de brotes de FD (6, 7, 8). Sin embargo, un reporte posterior que incluye el análisis de las secuencias genómicas de DENV-2 aislados entre 1997 y 2000, propone la evolución in situ a posibles virus recombinantes (genotipo mixto Americano/Asiático) (9). Durante la epidemia de dengue ocurrida en Aragua (Venezuela) en 1998, el riesgo de padecer FHD/SCD estuvo significativamente asociado a las infecciones con este DENV-2 genotipo mixto Americano/Asiático (10).

El DENV-1 es introducido en las Américas en el año 1977 y desde entonces ha sido señalado como responsable de la aparición de distintos brotes epidémicos asociados con diferentes presentaciones clínicas (FD y/o FHD/SCD). Específicamente, en el Estado Aragua, el DENV-1 fue el serotipo detectado con mayor frecuencia por el sistema de vigilancia epidemiológica activa durante la epidemia del año 1998 (Figura 1) (LARDIDEV, 1998, datos no publicados). Posteriormente, entre 1999 y 2000 la circulación de este serotipo disminuye hasta hacerse indetectable durante el 2002 y casi todo el 2003, tiempo durante el cual ocurre en nuestro país una gran epidemia causada por DENV-3. Sin embargo, el DENV-1 comienza a ser detectado nuevamente en el estado Aragua en noviembre del año 2003, para luego incrementar su circulación hasta convertirse en el serotipo predominante a partir del año 2005 y, particularmente, durante el brote epidémico más grande y largo de la historia del dengue en Aragua que ocurrió entre julio de 2006 y Marzo de 2008 (Figuras 1 y 2) (LARDIDEV, 2009, datos no publicados)

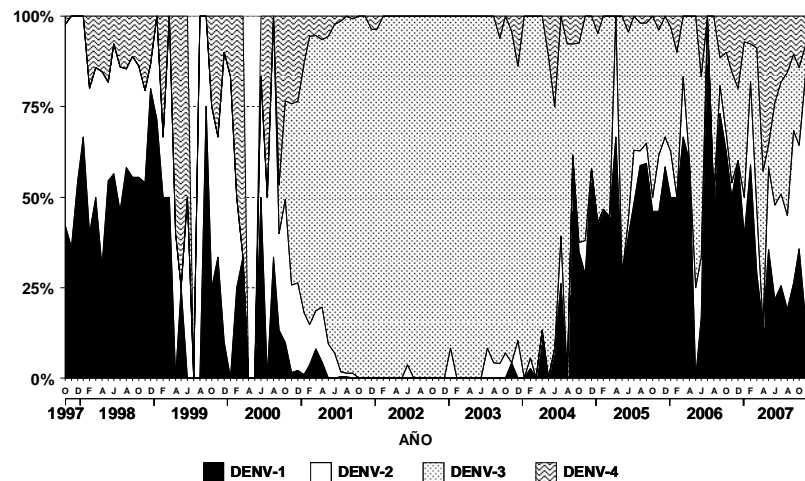


Figura 1. Serotipos del DENV detectados mediante aislamiento viral y/o RT-PCR) en el estado Aragua (Venezuela): Octubre 1997 – Diciembre 2007. Fuente: Registros de vigilancia epidemiológica proactiva del dengue en el estado Aragua. Laboratorio Regional de Diagnóstico del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV).

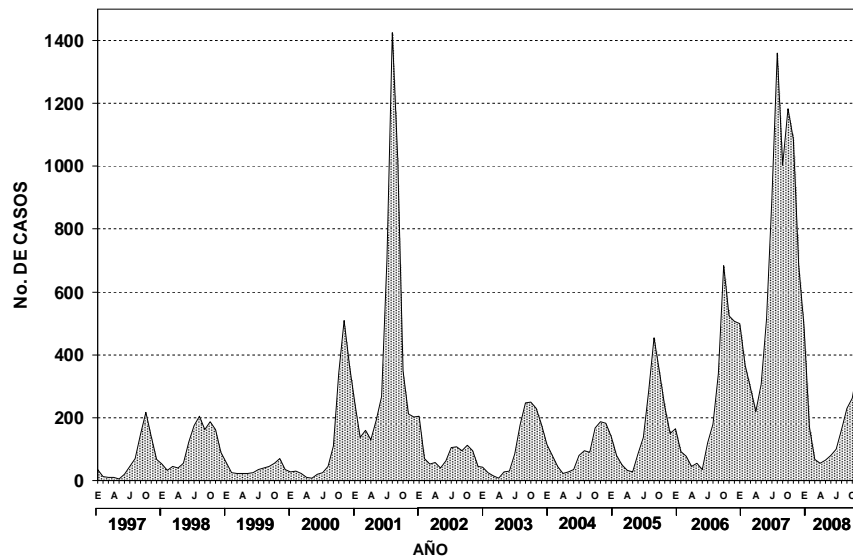


Figura 2. Casos de dengue detectados virológicamente (aislamiento viral y/o RT-PCR) y/o serológicamente (MAC-ELISA) en el estado Aragua (Venezuela): Enero 1997 – Diciembre 2008. Fuente: Registros de vigilancia epidemiológica proactiva del dengue en el estado Aragua. Laboratorio Regional de Diagnóstico del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV).

Desde el punto de vista filogenético, se ha descrito que la identificación de variantes genéticas del DENV está asociada a la severidad de la infección en los humanos (8). En el caso del DENV-1, las primeras investigaciones realizadas propusieron la existencia de tres a cinco variantes genéticas o genotipos, entre los cuales están los que han circulado en las Américas (6, 11). Se ha reportado la presencia de cepas de DENV-1 asociadas a casos de FD y de FHD (12). Por otra parte, durante la epidemia de dengue de Aragua (Venezuela) ocurrida en 1998, el riesgo de padecer FD estuvo significativamente asociado a las infecciones causadas por el serotipo DENV-1 (10). Sin embargo, independientemente de su posible asociación con el riesgo de sufrir FD o FHD/SCD, muy poco se conoce sobre la diversidad genética de los DENV-1 aislados en Venezuela. En este sentido, se reportó la clasificación de los DENV-1 aislados entre 1994-1995 en cinco linajes genéticos (13). Desde entonces, no se han realizado reportes de los genotipos circulantes del DENV-1 en nuestro país a pesar de la ocurrencia de varios brotes epidémicos en los cuales ha sido el serotipo predominante.

En el presente estudio se presenta la genotipificación de las cepas de DENV-1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 - 2007, basados en el análisis de la secuencia nucleotídica del genoma completo y la secuencia parcial de la región E/NS1, a fin de determinar sus relaciones filogenéticas con otros aislados virales de dicho serotipo de Venezuela y del resto del mundo. Así mismo, se discuten las posibles asociaciones de los genotipos virales encontrados con la severidad de los cuadros clínicos de los pacientes de los cuales fueron aislados y/o la magnitud del brote epidémico del año en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados virales. Se evaluaron 43 cepas de DENV-1 aisladas a partir de muestras de suero de pacientes provenientes del estado Aragua (Tabla I y II). Las muestras fueron colectadas durante el periodo 1997-2007 y corresponden a sueros recibidos a través del Sistema de Vigilancia del estado enviadas al Laboratorio Regional de Diagnostico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV) para su confirmación

Tabla 1. Listado de 18 DENV-1 aislados en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007.

Código LARDIDEV	Año de Aislamiento	Clínica	No. Acceso GenBank
LAR2130	1997	FD ^a	FJ639735
LAR3204	1998	FD	FJ639740
LAR3910	1998	FD	FJ639741
LAR4199	1999	FHD ^b /SCD ^{c,d}	FJ639743
LAR22849	2004	FDMH ^e	FJ639794
LAR24424	2004	FD**	FJ639797
LAR25025	2004	FD	FJ639802
LAR26987	2005	FD	FJ639813
LAR27521	2005	FD	FJ639814
LAR27527	2005	FDMH	FJ639815
LAR29598	2006	FD	FJ639818
LAR29629	2006	FD	FJ639819
LAR29635	2006	FD	FJ639820
LAR29665	2006	FD	FJ639821
LAR29689	2006	FD	FJ639823]
LAR29821	2006	FD	FJ639824
LAR40246	2007	FD	EU482610
LAR40325	2007	FD	EU482611

^aFiebre de Dengue;

^bFiebre Hemorrágica de Dengue;

^cSíndrome de Choque por Dengue;

^dFallecido;

^eFiebre de Dengue con manifestaciones hemorrágicas;

**Trombocitopenia (<100.000 plaquetas/mm³)

La clasificación clínica de los pacientes se hizo siguiendo los criterios descritos por la Organización Mundial de la Salud (14). De los 43 aislados virales de DENV-1, 18 (Tabla 1) fueron enviados al Instituto Broad (Massachusetts, Estados Unidos de América) para la secuenciación del genoma viral completo, mientras que 25 virus (Tabla 2) fueron enviados al Laboratorio de Arbovirus, del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, España), para secuenciar el segmento de unión E/NS1.

Tabla 2. Listado de 25 DENV-1 aislados en el estado Aragua durante el año 2006 empleadas en el estudio para la secuenciación de la región E/NS1

Código LARDIDEV	Clínica
29850	FD ^a
29922	FD
30082	FD
30330	FD
30713	FD
31186	FD
31827	FD
32133	FD
32149	FD
32195	FD
32252	FD
32269	FHD ^b
32287	FD
32321	FD
32452	FD
32908	FD
32962	FD
33008	FD
33078	FD
33337	FD
33696	FD
33700	FD
33712	FD
33715	FD
34012	FD

^aFiebre de Dengue

^bFiebre Hemorrágica de Dengue

Aislamiento e Identificación de las cepas virales: las cepas de DENV-1 se aislaron inoculando los sueros de los pacientes en tubos con monocapa confluyente de la línea celular C6/36-HT (derivada de *Aedes albopictus*) para su posterior incubación a 33°C durante 10 días (15). La identificación del serotipo viral se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia, donde se enfrentaron las células infectadas contra un panel de anticuerpos monoclonales (AcMc) contra DENV. Estos AcMc fueron HB47 (15F3-1) para DENV-1, HB46 (3H5) para DENV-2, HB49 (5D4-11) para DENV-3, y HB48 (1H10-6) para DENV-4 (16) y fueron provistos gentilmente por Center for Diseases Control and Prevention (CDC, San Juan Puerto Rico).

Extracción del ARN viral. El ARN viral se extrajo a partir de 140 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivos celulares de DENV-1 empleando el mini kit de extracción viral de ARN QIAamp QIAGEN® (QIAGEN Inc.; Valencia, California, E.U.A), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la extracción se resuspendió en 60 µL de agua y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Secuenciación del genoma completo. La secuenciación del genoma viral completo de 18 DENV-1 (Tabla I) se realizó en el Instituto Broad siguiendo un protocolo estándar diseñado en dicho instituto (17). Brevemente, el ARN viral fue amplificado mediante la técnica de Transcripción Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) con cebadores específicos para producir 12 amplicones solapados de 1.5 - 2kb. Seguidamente, dichos amplicones se mezclaron para realizar la reacción de secuenciación con 96 pares de cebadores específicos (tabla con la información de dichos cebadores disponible a petición del interesado) que dieron lugar a la amplificación de un número equivalente de regiones entre 500 a 700 pares de bases. La reacción de secuenciación se realizó en un equipo ABI 3730 mediante el método de Sanger de acuerdo a los protocolos de secuenciación del Instituto Broad. Finalmente, se procedió a ensamblar las secuencias obtenidas mediante el uso de programas de Bioinformática que permitieron conseguir las secuencias consenso las cuales fueron depositadas en el GenBank.

Secuenciación del segmento unión E/NS1. La secuenciación del segmento unión E/NS1 de 25 aislados de DENV-1 (Tabla 2) se realizó siguiendo una adaptación del protocolo descrito previamente (18). Brevemente el segmento segmento unión E/NS1 fue amplificado a partir del ARN viral mediante la técnica RT-PCR. El amplicón específico para DENV-1 (420 pb) se visualizó mediante gel de agarosa al 2%. Seguidamente, el ADNc a secuenciar purificó utilizando el QIAGEN MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN Inc.; Valencia, California, E.U.A), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, los ADNc de la región E/NS1 fueron secuenciados y amplificados mediante PCR en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.; Waltham, Massachusetts, E.U.A), utilizando el estuche de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; Foster City, California, E.U.A). El análisis de los productos secuenciados se realizó con el equipo ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, California, E.U.A). Las secuencias obtenidas fueron revisadas mediante el programa de computación (software) CHROMAS (versión 1.3, 1996; C. McCarthy, School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science and Technology, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia). Seguidamente, las secuencias sentido y anti-sentido fueron alineadas mediante el programa de computación (software) SEQMAN (DNASTAR Inc. Software, Madison, Wisconsin.) Las secuencias consenso

fueron comparadas y alineadas con las secuencias obtenidas del GenBank utilizando el programa de computación (software) CLUSTAL X, versión 1.83 (19).

Análisis filogenético. Se realizó utilizando el programa de computación (software) MEGA4 (20). El árbol filogenético óptimo fue generado mediante el método de Neighbor-Joining (21). La significancia estadística de la topología particular de los árboles se evaluó a través de la prueba de bootstrap (22). Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Tamura-Nei (23).

RESULTADOS

En el presente estudio se muestran los resultados de la secuenciación y genotipificación de las secuencias de los genomas completos de 18 DENV-1 aislados de pacientes provenientes de los diferentes municipios del estado Aragua, durante los años 1997 - 2007. Asimismo, los resultados de de la secuenciación y genotipificación de 328 nucleótidos de la región de unión E/NS1 de 25 DENV-1 aislados durante el año 2006. Las secuencias de los DENV-1 de Aragua fueron alineadas con las correspondientes de otros aislados virales del mundo (genoma completo y segmento E/NS1) que han sido depositadas en el GenBank. Una vez alineadas las secuencias respectivas, se procedió a la realización de dos árboles filogenéticos: uno con las secuencias de los genomas completos (Figura 3) y otro con las secuencias de la región E/NS1 (Figura 4)

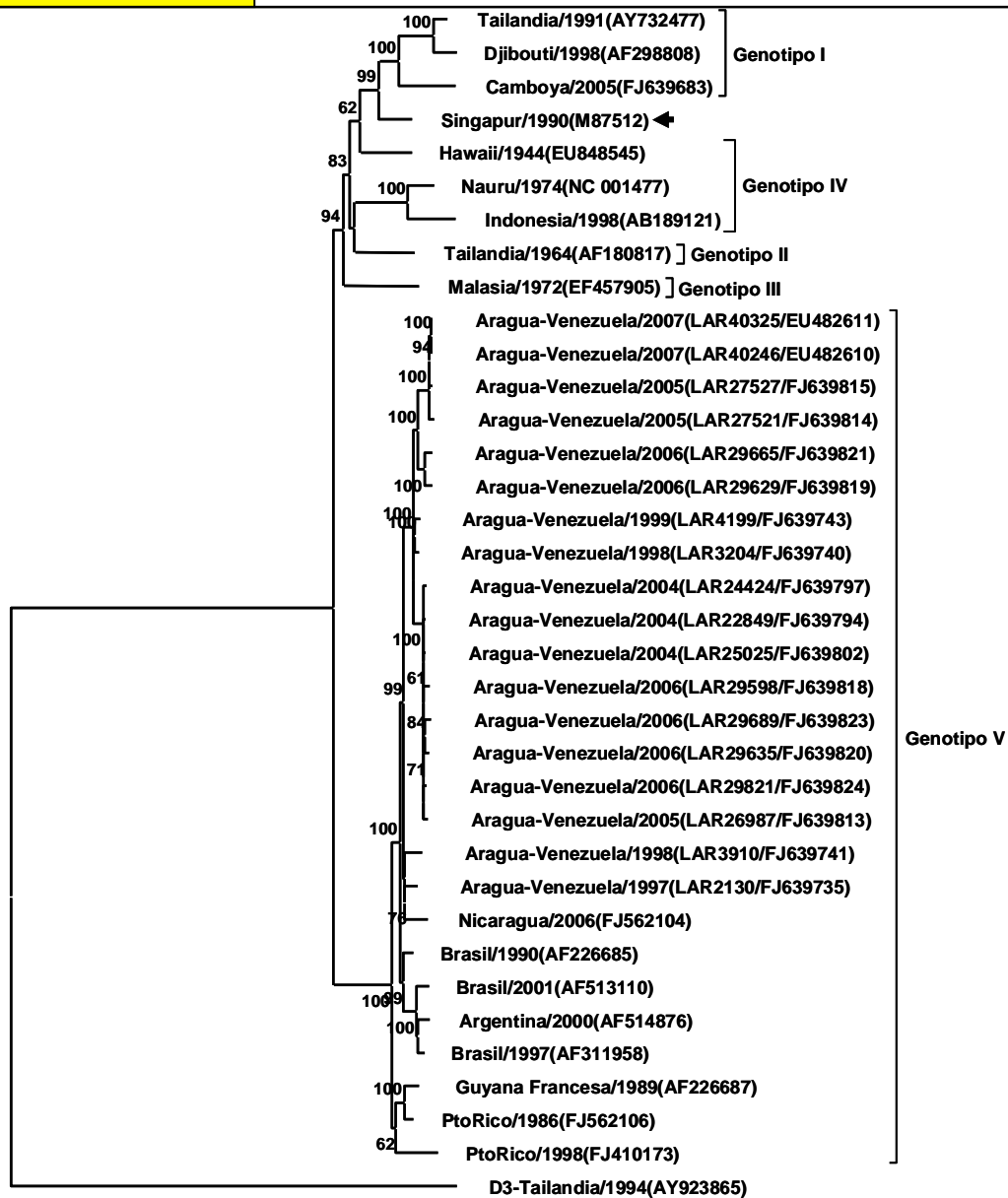


Figura 3. Relaciones evolutivas de treinta y seis DENV-1 aislados en el estado Aragua y algunos países del mundo, basadas en las secuencias nucleotídicas del genoma completo. El análisis filogenético se realizó con el programa de computación (software) MEGA4 (20). El árbol filogenético óptimo fue generado mediante el método de Neighbor-Joining (21). En cada una de las ramas se indican los porcentajes ≥ 60 de las réplicas de los árboles mediante el test de bootstrap de 1000 replicas) (22). Las distancias evolutivas fueron calculadas mediante el método de Tamura-Nei (23). Cada aislado es denominado de acuerdo al área geográfica de procedencia, el año de aislamiento, el código del LARDIDEV en los aislados virales del estado Aragua, y el número de acceso en el Genbank en los virus de otros países del mundo.

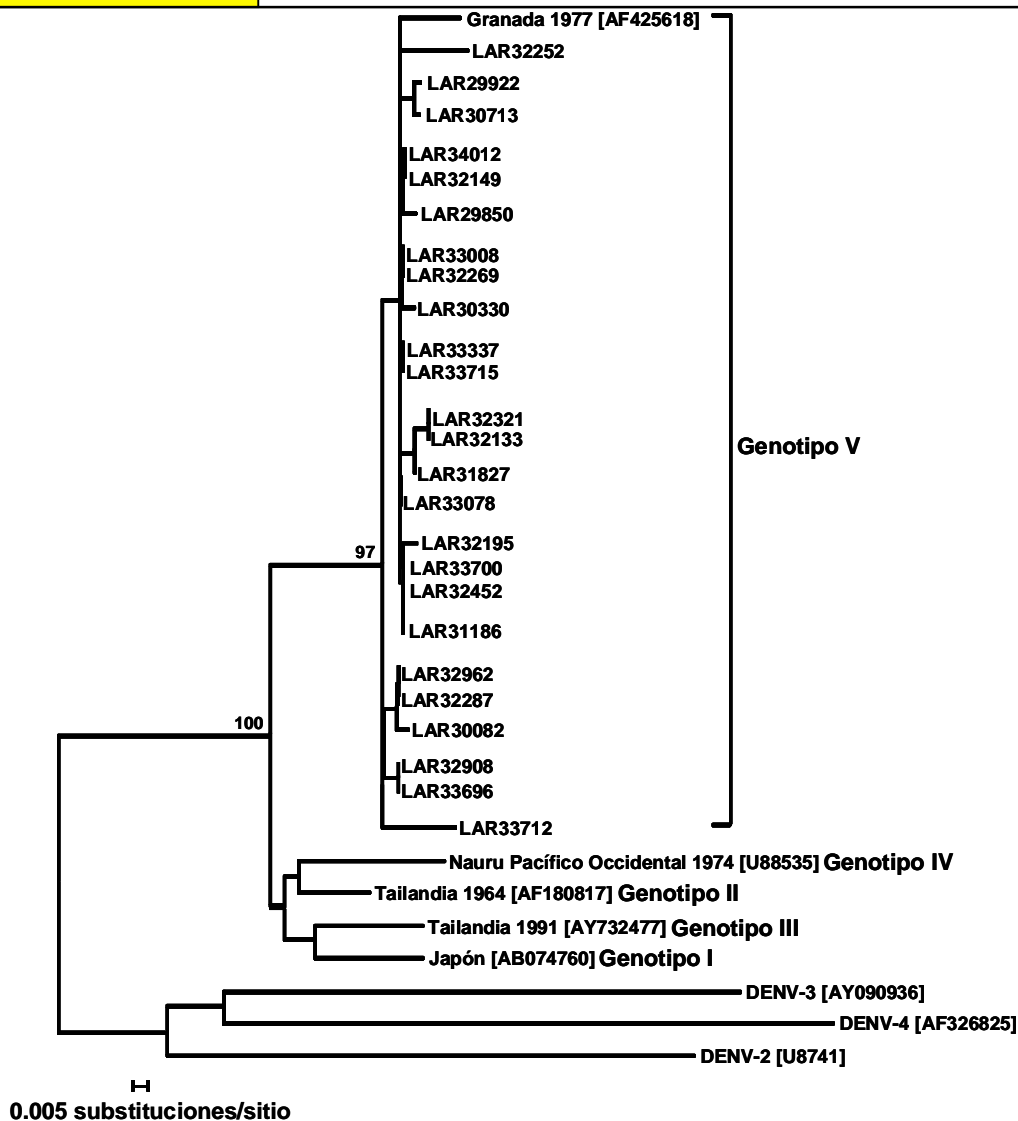


Figura 4. Árbol filogenético correspondiente a la secuencia parcial de la región E/NS1 de 25 DENV-1 aislados durante el año 2006. Las condiciones experimentales son las mismas descritas en la figura 3, excepto que la significancia estadística de la topología determinó mediante el test de bootstrap de 500 réplicas.

La Figura 3, corresponde al árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias completas de aislados de DENV-1 en Aragua (Venezuela) durante el periodo 2004 - 2007 y de aislados de otros países, donde se establece la relación de parentesco entre dichos aislados virales. El árbol generado muestra la existencia de cuatro grupos correspondientes a los genotipos descritos previamente como I, II, IV y V (13). Así mismo se observa que los aislados virales de las Américas (Argentina, Brasil, Guyana Francesa, Nicaragua, Puerto Rico y Venezuela) se ubicaron en el genotipo V. También se advierte la división en dos linajes, o clados, del genotipo V: el primer clado constituido por virus aislados en Puerto Rico (1986 y 1998) y en Guyana Francesa (1989), y el segundo clado conformado por aislados virales de Argentina (2000), Brasil (1990), Nicaragua (2006) y Venezuela (1997 - 2007). Los virus venezolanos, a su vez, están distribuidos en dos linajes: un linaje conformado por algunas cepas aisladas en 1997 y 1998,

que comparten un ancestro común con el virus aislado en Nicaragua (2006), y otro linaje conformado por cepas aisladas en el período 1998 – 2007.

Las 18 cepas venezolanas tuvieron 24 sustituciones no-conservativas de aminoácidos (aa) en los genes que codifican las proteínas PrM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A y NS5 (Resultados no mostrados). Los dos linajes de cepas venezolanas se distinguen inequívocamente por sustituciones de aa en las posiciones de E-297, NS1-146, NS2B-70 y NS4B-17.

La Figura 4 representa el árbol filogenético generado a partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento E/NS1 de los DENV-1 circulantes en Aragua durante el año 2006, demostrando el mismo patrón de genotipificación observado con el análisis filogenético de las secuencias del genoma completo (Ver Figura 3).

Desde el punto de vista clínico, en la tabla I se observa que las DENV-1 mostraron un amplio espectro clínico en los pacientes de los cuales fueron aislados, demostrando así su capacidad de producir desde las formas leves de la enfermedad (FD) hasta las más formas severas (FHD/SCD) de la enfermedad, incluso la muerte (aislado LAR4199).

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra los resultados de la genotipificación de cepas de DENV-1 circulantes en el estado Aragua entre 1997 y 2007, con énfasis en los aislados detectados a partir del año 2006. Desde el punto de vista histórico, el año 2006 se destaca como el momento que dio inicio a la epidemia de dengue de mayor magnitud y duración que se haya registrado en Venezuela, coincidiendo además con un repunte en la circulación de DENV-1 que había dejado de ser detectado durante dos años consecutivos desde Septiembre del 2001 hasta su reaparición en Noviembre de 2003 (Figuras 1 y 2).

La introducción del serotipo DENV-1 en las Américas ocurrió a través de Jamaica, proveniente posiblemente del continente africano (Nigeria) o asiático (Sri Lanka), donde se inició una pandemia que se extendió prácticamente a todas las islas del Caribe (5, 24, 25). En América del Sur y Central, la epidemia comenzó en 1978 afectando a Venezuela, Colombia, Guyana, Surinam y Guayana Francesa, Honduras, El Salvador, Guatemala y Belice; luego se propagó hacia el norte llegando hasta Méjico (1978) y el sur del estado de Texas en los E.U.A. (1980) (5, 24). El predominio del serotipo DENV-1 en la etiología de la epidemia de dengue ocurrida en Venezuela en 1978, fue demostrado por Walder y Suárez (26).

Son muy escasos los estudios sobre la diversidad genética y/o genotipificación de DENV-1 que incluyen aislados venezolanos (6, 12, 13, 27). Con algunas diferencias respecto a la nomenclatura de clasificación, los aislados venezolanos han sido tipificados por algunos investigadores como genotipo I (6) y por otros como genotipo V (13) y genotipo América-África (AMAF) (27). En el presente estudio, el análisis de las secuencias nucleotídicas de los DENV-1 aislados en Aragua durante el período de estudio mencionado permitió clasificarlo dentro del genotipo V (13) (Figuras 3 y 4).

El hallazgo más relevante del presente estudio fue el agrupamiento de los DENV-1 aislados aragüeños en dos linajes (clados) que incluyen cepas

aisladas en períodos de tiempo diferentes (Figura 3). Esto sugiere que probablemente ocurrió un reemplazo del linaje de los aislados virales circulantes en 1997 y 1998 por el linaje que agrupa todos los virus circulantes entre 2004 y 2007, además de algunos obtenidos en 1998 y 1999. Las sustituciones no-conservativas de aminoácidos (aa) en las posiciones de E-297, NS1-146, NS2B-70 y NS4B-17 sugieren que ambos linajes son lo suficientemente distintas como para inferir que hubo un reemplazo del clado (1997 – 1998) por otro (1998 – 2007). Previamente se reportó un evento similar en Tailandia donde un clado de DENV-1 (1980 – 1994), constituido por todas las cepas detectadas en 1980 y la mayoría de las encontradas en 1994, fue reemplazado por otro (1990 – 2000) conformado por una minoría de las cepas obtenidas en los comienzos de 1990 y todas las circulantes entre 1995 y 2000 (28). El reemplazo de linajes también ha sido reportado para los serotipos DENV-3 (28) y DENV-4 (29).

Por otro lado, la posibilidad de que el número de aislados virales colectados en el período 1997 – 1999 no haya sido suficiente como para concluir inequívocamente que se produjo el reemplazo de clados, plantea la necesidad de realizar la secuenciación y el análisis filogenético del genoma completo de un mayor número de aislados virales de dicho período 1997 – 1999 para corroborar/rechazar la hipótesis de reemplazo de clados. En este sentido ya se enviaron a secuenciar el genoma completo de DENV-1 aislados en los años 1997 (cuatro) y 1998 (tres), y solo estamos a la espera de las secuencias respectivas para realizar el análisis filogenético correspondiente.

Otro hallazgo de interés fue la ubicación filogenética del aislado de DENV-1 Singapur/1990 de origen asiático, el cual ha sido clasificado dentro del genotipo V (13), IV (30) o AMAF (27), basados en el análisis del gen E. En el presente estudio, el análisis filogenético del genoma completo del aislado viral Singapur/1990 demostró su parentesco con los virus agrupados en el genotipo I (Ver figura 3). Estudios previos han reportado este DENV-1 Singapur/1990 como un virus recombinante (27, 30, 31). Tal como se ha señalado en otras investigaciones donde se ha reportado recombinación génica dentro de un mismo serotipo viral (por ejemplo, la cepa venezolana DENV-2 Mara4), la ubicación filogenética va a depender de la existencia de secuencias nucleotídicas recombinantes en la región genómica analizada (9). En consecuencia, es razonable inferir que haya ocurrido algo similar en este análisis filogenético, corroborándose una vez más no solamente el carácter recombinante de la cepa DENV-1 Singapur/1990, si no también la importancia que tiene la selección del gen, o segmento génico, a secuenciar para efectos de la clasificación genotípica de cualquier aislado viral que pretenda estudiarse.

Adicionalmente, en al presente estudio se realizó la secuenciación y el análisis filogenético del fragmento del genoma viral correspondiente a la región de unión E/NS1 de 25 aislados de DENV-1 detectados en Aragua durante al año 2006. Es de recalcar que los primeros estudios filogenéticos de DENV-1 se realizaron haciendo uso de este fragmento (6, 11) permitiendo la clasificación de DENV-1 en tres a cinco genotipos, o grupos monofiléticos, que incluían las cepas circulantes en la región de las Américas. En el presente estudio, el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de la región unión E/NS1 permitió la clasificación de las cepas aragüeñas dentro del genotipo V, correspondiendo así con el resultado obtenido mediante el análisis de las secuencias completas del genoma. Hallazgos

similares han sido reportados por otros autores (18, 27, 32) quienes han empleado esta región del genoma como una herramienta que ha permitido la rápida clasificación de los DENV en distintos genotipos o subtipos. De este modo, se refuerza la vigencia y utilidad de esta estrategia sencilla, sensible, específica y rápida para la genotipificación para DENV (18, 27), particularmente en el marco de los sistemas de vigilancia epidemiológica para definir fuentes de epidemias e identificar de manera precisa la circulación temprana de genotipos emergentes.

Se reportó previamente (13) que las cepas venezolanas de DENV-1 agrupadas en el genotipo V tenían la capacidad de producir FD y FHD, sin embargo no pudo demostrarse la segregación de las mismas de acuerdo a la severidad de la enfermedad. A pesar de ello, los investigadores concluyeron que el genotipo V de DENV-1 posee el potencial para causar las formas severas de la enfermedad. En el caso de los aislados de DENV-1 de Aragua circulantes entre 1997 y 2007, se observó que igualmente son capaces de causar todo el espectro clínico de la enfermedad, incluyendo la muerte por SCD (Tabla I, código LAR4199). No se puede ignorar, sin embargo, la capacidad que tiene este serotipo de estar asociado a las altas tasas de morbilidad ocurridas en la mayoría de las grandes epidemias del estado Aragua.

Los resultados de esta investigación enfatizan la importancia de los estudios filogenéticos del DENV para determinar la diversidad genética tanto geográfica como temporal de los serotipos circulantes – en este estudio particular el DENV-1 – y la posible asociación entre la emergencia de clados dentro de un genotipo particular con la magnitud de los brotes epidémicos en términos de morbilidad y/o severidad de los casos.

Agradecimientos. Los datos genómicos fueron generados por el Centro de Secuenciación Genómica para Enfermedades Infecciosas del Instituto Broad, auspiciado por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (National Institute of Allergy and Infectious Disease [NIAID]), como parte del proyecto del genoma dengue del Consorcio Dengue de Recursos de Genoma (Genome Resources in Dengue Consortium (GRID) dengue genome Project) (<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/Home.html>); agradecemos al GRID por la rápida cesión de los datos genómicos. Los autores también agradecen al Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda, Madrid, España, por su invaluable contribución consistente en la realización de las secuencias completas y parciales de los virus analizados en este estudio. Igualmente, nuestro agradecimiento a la Corporación de Salud del Estado Aragua (CORPOSALUD ARAGUA), y en especial a las Direcciones de Salud y Epidemiología, por su contribución en la captación y diagnóstico, a través del programa vigilancia epidemiológica del dengue, de la mayoría de los pacientes de los cuales de aislaron los DENV-1 reportados en este estudio. Asimismo, agradecemos al Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos (Naval Medical Research Center Detachment [NMRC]), en Lima, Perú, por su contribución consistente en el financiamiento y diseño de los proyectos de investigación a través de los cuales se captaron y diagnosticaron algunos de los pacientes de los cuales de aislaron los DENV-1 reportados en este estudio. Finalmente, nuestro eterno agradecimiento al personal de Salud de CORPOSALUD ARAGUA por su desinteresada y anónima colaboración.

Financiamiento. El financiamiento para la realización de este estudio provino de: a) fondos Federales del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (National Institute of Allergy and Infectious Disease), Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health), Departamento de Salud y Servicios Humanos (Department of Health and Human Services) de los E.U.A., bajo el contrato No. HHSN266200400001C; y b) la Unidad de Trabajo No. 800000.82000.25GB.B0016, del

Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos (NMRC), de Lima, Perú.

Exención de responsabilidades. Los puntos de vista expresados en este manuscrito son únicamente de sus autores y no necesariamente representan la opinión la política oficial o la posición del Departamento de la Marina, Departamento de Defensa, o gobierno de los E.U.A.

Declaración de derechos de autor. Copyright Statement. El autor Tadeusz J. Kochel, es un militar en servicio activo del gobierno de los E.U.A. Este trabajo fue preparado como parte de sus deberes oficiales. El Título 17 U.S.C. § 105 provee que no está disponible la protección del derecho de autor para ningún trabajo del gobierno de los E.U.A. El Título 17 U.S.C. § 105 define como trabajo del gobierno de los E.U.A como aquel realizado por militares en servicio activo o empleados del gobierno de E.U.A como parte de sus deberes oficiales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 480-496.
2. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva (Switzerland): World Health Organization; c1997. Chapter 1, General considerations; p. 1-4.
3. Kourí GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. 1981. Bull World Health Organ 1989; 87: 375-380.
4. Organización Panamericana de la Salud. El Dengue en las Américas. 1980-1987. Boletín Epidemiológico 1989; 20: 1-16.
5. 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): 161-169.
6. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology 1990; 174(2): 479-493.
7. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology 1997; 230(2): 244-251.
8. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999; 73(6): 4738-4747.
9. Uzcátegui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcátegui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. J Gen Virol 2001; 82: 2945-2953.
10. Camacho DE, Alvarez M, Soler M, de Quintana M, Chiarello A, Sierra G, Rodríguez F, Comach G. Diagnóstico de laboratorio de infecciones por el virus dengue en el Estado Aragua; Venezuela: Octubre 1997-Diciembre 1998. Inv Clin 2003; 44 (2): 91-103.
11. Chung E, Cassar O, Drouet MT, Guzman MG, Laille M, Rosen L, Dubel V. Molecular epidemiology of dengue-1 y dengue-4 viruses. J Gen Virol 1995; 76: 1877-1884.
12. Salas RA, Tovar D, Barreto A, de Miller E, Leitmeyer K, Rico-Hesse R. Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990 – 1997. Acta Cient Venez 1998; 49(Sup. 1): 33-37.
13. Goncalvez A, Escalante A, Pujol F, Ludert J, Tovar D, Salas R, Liprandi F. Diversity and evolution of the envelope gene of Dengue virus type 1. Virology. 2002; 303: 110-119.
14. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para la prevención y el control. OPS. Washington DC; Publicación Científica. 1995; 548.
15. Gubler D, Kuno G, Sather G, Vélez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am J Trop Med Hyg 1984; 33: 158-165.
16. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am J of Trop Med and Hyg 1982; 31: 830-836.

17. Broad Institute (2009) [en línea]. Dengue Virus Database: Sequencing & Assembly. Disponible en: <http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/SequencingAssembly.html>. [Consulta: 2009, Abril]
18. Domingo C, Palacios G, Niedrig M, Cabrerizo M, Jabado O, Reyes N, Lipkin I, Tenorio A. A New Tool for the Diagnosis and Molecular Surveillance of Dengue Infections in Clinical Samples. *Dengue Bull* 2004; 28.
19. Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(24): 4876-4882.
20. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24: 1596-1599.
21. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4: 406-425.
22. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1987; 39: 783-791.
23. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10: 512-526.
24. Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol Bull* 1989; 10(1):1-8.
25. Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(3): 577-589.
26. Walder R, Suarez OM. Epidemia de dengue, 1978. *Boletín Informativo sobre dengue, la fiebre amarilla y el Aedes aegypti en las Américas* 1979; VIII (1): 13-14.
27. Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, Gascón J, Cabrerizo M, Lipkin WI, Tenorio A. 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; 44(4): 1519-1529.
28. Zhang C, Mammen P, Mammen Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongde P, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes E. Clade Replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 2005; 79(24): 15123-15130.
29. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan, WO. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 1650-1658.
30. Laille M, Roche C. Comparison of dengue virus envelope glycoprotein gene sequences from French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(4): 478-484.
31. Tolou H, Couissinier-Paris P, Durand J, Mercier V, de Pina J, de Micco P, Billoir F, Charrel R, de Lamballerie X. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genoma sequences. *J. Gen Virol* 2001; 82: 1283-1290.
32. Zaki A, Perera D, Shan Jahan S, Cardoso M. Phylogeny of dengue viruses circulating in Jeddah, Saudi Arabia: 1994 to 2006. *Trop Med Int Health* 2008; 13(4): 584-592.