



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL DENGUE TIPO 1 (DENV-1)
CAUSANTE DE INFECCIONES HUMANAS ENTRE 2011 Y 2019 EN EL
DEPARTAMENTO CENTRAL, PARAGUAY”**

CÉSAR ANDRÉS CANTERO RAMÍREZ

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL DENGUE TIPO 1 (DENV-1)
CAUSANTE DE INFECCIONES HUMANAS ENTRE 2011 Y 2019 EN EL
DEPARTAMENTO CENTRAL, PARAGUAY”**

CÉSAR ANDRÉS CANTERO RAMÍREZ

Tutor: B.C. Alejandra María Rojas Segovia, MSc.

Co-tutor: Prof. Dr. Jesse Julian Waggoner, MD.

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Cantero Ramírez, César Andrés

Variabilidad genética del virus del dengue tipo I (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central, Paraguay / César Andrés Cantero Ramírez, Tutora: Alejandra María Rojas Segovia, Co-tutor: Jesse Julian Waggoner.- - San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xvi, 97; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ, 2021

1. Virus del dengue 2. Variación genética I. Título

CDD (ed. 18^a) 616.921
C167v



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA BC. ALEJANDRA MARÍA ROJAS SEGOVIA, MSc., DOCENTE INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central, Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante César Andrés Cantero Ramírez para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 1 días del mes de junio de 2021.

Tutora: B.C. Alejandra María Rojas Segovia, MSc.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL PROF. DR. JESSE JULIAN WAGGONER, MD, INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DIVISION DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LA ESCUELA DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE EMORY (ATLANTA, GEORGIA, EUA).

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central, Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante César Andrés Cantero Ramírez para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 1 días del mes de junio de 2021.

Co-Tutor: Prof. Dr. Jesse Waggoner, MD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y2019 en el Departamento Central, Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el estudiante César Andrés Cantero Ramírez para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF. BC. ALEJANDRA MARÍA ROJAS SEGOVIA, MSc.** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 2 días del mes de junio de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central, Paraguay.

Trabajo de tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

César Andrés Cantero Ramírez

Aprobado el 28 de junio de 2021

Tribunal examinador:

Evaluador 1: Dra. Rosa María Guillén Fretes, PhD. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, IICS-UNA, Asunción, Paraguay.

Evaluador 2: Dra. María José Fernández de Nestosa, PhD. Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay.

Evaluador 3: Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi, PhD. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay.

Evaluador Invitado: Lic. Emilio Eduardo Espínola Estigarribia, MSc. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, IICS-UNA, Asunción, Paraguay.

B.C. Alejandra María Rojas Segovia, MSc.
Tutora

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ



Universidad Nacional de Asunción

RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
UNIDAD DE DOCENCIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
 Campus de la UNA, San Lorenzo – Paraguay
 postgrado@iics.una.py
 Teléfono: 595 021 326 5411



ACTA DE EVALUACIÓN

EVALUACIÓN DE	DEFENSA PÚBLICA DE TESIS
NÚMERO DE CREDITOS	S/N
PROGRAMA	Maestría en Ciencias Biomédicas

TÍTULO DE PROYECTO DE TESIS	Variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (denv-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central, Paraguay
------------------------------------	---

DICTAMEN:

APELLIDO Y NOMBRE	CALIFICACIÓN	
	NÚMERO	LETRAS
CANTERO RAMÍREZ, CÉSAR ANDRÉS	5	Cinco

ACTA: MCB-090	FECHA: 28 de junio del 2021
----------------------	------------------------------------

PRESIDENTE	
Prof. Dra. Rosa María Guillén Fretes, PhD.	
MIEMBROS	
Prof. Dr. Julio César Masura Ichisa Ouchi, PhD.	
Prof. Dra. María José Fernández de Nestosa, PhD.	

OBSERVACIÓN:
1. Participa de esta mesa examinadora el Lic. Emilio Eduardo Espínola Estigarribia, MSc, como evaluador internacional invitado, de manera remota desde la Universidad Estatal de Georgia, Atlanta, EE. UU. El dictamen es consensuado entre los 4 miembros, cuyas sugerencias constan en los baremos adjuntos.
2. El tribunal evaluador decide por unanimidad asignar la calificación “SOBRESALIENTE CUM LAUDE”

AGRADECIMIENTOS

A Dios, sobre todas las cosas, por sostenerme durante el proceso.

A mi mamá por brindarme apoyo incondicional y ser mi soporte en todo momento.

A mi tutora la MSc. Alejandra Rojas, por las enseñanzas, el apoyo brindado, el acompañamiento y la confianza desde el inicio en este proceso

A mi co-tutor el Dr. Jesse Waggoner por la valiosas orientaciones, el acompañamiento y el seguimiento en los procesos de este trabajo.

Al Departamento de Producción del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, por haberme abierto las puertas y permitirme llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Magaly Martínez por las valiosas orientaciones brindadas durante el desarrollo del trabajo.

A la MSc. Fátima Cardozo por las colaboraciones y ayudas en el desarrollo del estudio.

A mis compañeros de Maestría, por el apoyo, el soporte y amistad brindada desde el inicio de la Maestría

Al Conacyt por el apoyo financiero para llevar a cabo la Maestría.

A todas aquellas personas que han que me han apoyado durante el desarrollo de esta etapa.

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DEL DENGUE TIPO 1 (DENV-1) CAUSANTE DE INFECCIONES HUMANAS ENTRE 2011 Y 2019 EN EL DEPARTAMENTO CENTRAL, PARAGUAY

César Cantero*, Alejandra Rojas, Jesse Waggoner*****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Producción del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

*** Departamento de Medicina, División de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Medicina, Universidad de Emory. Atlanta, Georgia, EUA

RESUMEN

Los arbovirus son considerados agentes causales de infecciones humanas en todo el mundo, entre ellos se destaca el virus del dengue (DENV) que presenta cuatro tipos antigénicamente relacionados, pero genéticamente distintos (DENV-1-2-3-4). El DENV-1 ha circulado en el Paraguay desde el 2009 de forma sostenida hasta el 2019, esto podría estar relacionado con cambios a nivel genético que intervienen en variaciones antigénicas, dotando al virus la capacidad de persistir en un periodo de tiempo en una determinada región geográfica. El objetivo del trabajo fue analizar la variabilidad genética del DENV-1 causante de infecciones humanas entre 2011 a 2019 en el Departamento Central del Paraguay, para lo cual se realizó un estudio observacional, descriptivo de corte transversal. Fueron seleccionadas un total de 55 muestras positivas para DENV-1 correspondientes a los años 2011, 2016 y 2018, a partir de las mismas se amplificó el gen del proteína de la envoltura (proteína E) y posteriormente se secuenció. Fueron obtenidas 44 secuencias nucleotídicas, todas correspondían al genotipo V de DENV-1. En base al análisis filogenético fue evidenciada la presencia de cinco grupos distintos para los DENV-1 detectados en Paraguay. La mayor divergencia nucleotídica se presentó en las secuencias del 2016, las mismas se distribuyeron en tres grupos distintos. Los cambios a nivel aminoacídico en ciertas posiciones (E₃₂₅, E₃₃₈, E₃₆₁, E₃₉₄, E₄₂₈ y E₄₃₆) fueron característicos para diferenciar a los grupos en el árbol filogenético construido. En este estudio se pudo evidenciar la variabilidad genética del DENV-1 circulante en Asunción y el Departamento Central en distintos años. Los cambios descritos a nivel de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 podrían afectar al proceso de neutralización viral. Se resalta la importancia de contar con estudios de variabilidad genética del DENV en el país, a fin de aportar conocimientos relacionados a persistencia del virus, cambios en la incidencia o gravedad de la enfermedad.

Palabras claves: virus del dengue, proteína de la envoltura, variabilidad genética

GENETIC VARIABILITY OF DENGUE VIRUS TYPE 1 (DENV-1) CAUSING HUMAN INFECTIONS BETWEEN 2011 AND 2019 IN THE CENTRAL DEPARTMENT, PARAGUAY

César Cantero*, Alejandra Rojas, Jesse Waggoner*****

*** Master of Biomedical Sciences student, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción**

****Departamento de Producción of Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción**

*****Emory University, Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, USA.**

ABSTRACT

Arboviruses are considered agents of human infections throughout the world, among them dengue virus (DENV) stands out, which has four antigenically related but genetically distinct types (DENV-1-2-3-4). DENV-1 circulated in Paraguay from 2009 on a sustained basis until 2019. This could be related to changes at the genetic level that result in antigenic variations, giving the virus the ability to persist for a period of time in a certain geographic region. The aim of this work was to analyze the genetic variability of DENV-1 that caused human infections between 2011 and 2019 in Central Department of Paraguay, and an observational, descriptive cross-sectional study was carried out. A total of 55 samples positive for DENV-1 corresponding to the years 2011, 2016 and 2018 were selected, from which the gene for the viral envelope protein (protein E) was amplified and subsequently sequenced. Forty-four nucleotide sequences were obtained, all of which corresponded to the DENV-1 genotype V. Based on the phylogenetic analysis, there was evidence for the presence of five different groups of DENV-1 detected in Paraguay. The greatest nucleotide divergence occurred in the 2016 sequences, they were distributed in three different groups. Changes at the amino acid level at certain positions (E₃₂₅, E₃₃₈, E₃₆₁, E₃₉₄, E₄₂₈ and E₄₃₆) were characteristic to differentiate the groups in the constructed phylogenetic tree. In this study it was possible to demonstrate the genetic variability of the circulating DENV-1 in Asunción and the Central Department in different years. The changes described at the amino acid level in the E protein of DENV-1 could affect the viral neutralization process. The importance of having DENV genetic variability studies in the country is highlighted, in order to provide knowledge related to the persistence of the virus, changes in the incidence or severity of the disease.

Keyword: dengue virus, envelope protein, genetic variability

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Dengue. Enfermedad. Generalidades	2
1.2 Breve historia	2
1.3 Clasificación. Tipos. Fases de Evolución. Manifestaciones Clínicas	3
1.4 Características estructurales y moleculares del virus del Dengue.....	5
1.5 Ciclo de replicación del virus.....	6
1.6 Transmisión por vectores	8
1.7 Inmunopatogenia.....	9
1.8 Clasificación genotípica	11
1.9 Diagnóstico.....	13
1.9.1 Reacción cruzada.....	16
1.10 Epidemiología	16
1.10.1 Situación en América.....	16
1.10.2 Situación en el Paraguay.....	17
1.11 Impacto.....	18
1.12 Justificación.....	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. METODOLOGÍA.....	22
3.1 Diseño del estudio	23
3.2 Población de estudio.....	23
3.3 Controles	23
3.4 Extracción de ARN viral	24
3.5 Detección de genomas virales mediante RT-PCR en tiempo real	24

3.6 Control interno RNasa-P	25
3.7 Tipificación de muestras positivas para DENV mediante RT-PCR en tiempo real.....	26
3.8 Cálculo para cuantificación de carga viral	27
3.9 Transcripción reversa	27
3.10 Amplificación del gen que codifica la Proteína E.....	28
3.11 Secuenciación.....	29
3.12 Análisis Filogenético de las secuencias nucleotídicas	29
3.12.1 Secuencias obtenidas y análisis inicial	29
3.12.2 Base de datos de secuencias del GenBank	30
3.12.3 Análisis filogenético	30
3.13 Análisis de la Proteína de la Envoltura:	31
3.14 Asuntos éticos:	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Detección, tipificación y cuantificación de DENV-1.....	34
4.2 Amplificación del gen que codifica para la proteína de la Envoltura	36
4.3 Secuenciación.....	36
4.4 Análisis filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína E de DENV-1	37
4.5 Análisis de la divergencia nucleotídica	46
4.6 Distribución geográfica por año de las muestras secuenciadas.....	47
4.7 Análisis de temporalidad y distribución geográfica del DENV-1 detectado en 2016 ...	48
4.8 Análisis de la Proteína E	49
5 DISCUSIÓN.....	55
6 CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Curso de la enfermedad del dengue.	4
Figura 1.2: Estructura del genoma del virus del dengue.	5
Figura 1.3: Estructura de la proteína de la Envoltura de DENV	6
Figura 1.4: Ciclo de replicación del DENV.	7
Figura 1.5: Ciclo de transmisión del DENV.....	9
Figura 3.1: Esquema de ubicación de los cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica la Proteína E.	28
Figura 3.2: Esquema de ubicación de los cebadores empleados para la secuenciación del gen que codifica la Proteína E.	29
Figura 4.1: Curvas de amplificación de muestras en las cuales se detectó la presencia del genoma de DENV-1 por rRT-PCR.	34
Figura 4.2: Resultados de la amplificación del gen de la Proteína E	36
Figura 4.3: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 obtenido mediante la herramienta <i>Dengue Virus Typing Tool</i>	39
Figura 4.4: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) mediante el método de Máxima verosimilitud (<i>Maximun likelihood</i>).	42
Figura 4.5: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para los grupos I, II y III	43
Figura 4.6: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para el grupo IV.....	44
Figura 4.7: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para el grupo V	45
Figura 4.8: Representación de la estructura de la proteína de la Envoltura (Dímero) de DENV-1 obtenida mediante el Programa <i>Chimera UCSF</i>	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: Distribución geográfica mundial de los genotipos de DENV	13
Tabla 4.1: Resultados de tipos de dengue por año.....	35
Tabla 4.2: Estimaciones de divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias de DENV-1 detectado en Paraguay en diferentes años.....	46
Tabla 4.3: Estimaciones de divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias dentro de grupos de DENV-1 detectado en Paraguay en diferentes años.....	47
Tabla 4.4: Distribución geográfica de las muestras secuenciadas por año	48
Tabla 4.5: Fecha de toma de muestra de las muestras positivas para DENV-1 en las que se obtuvieron secuencias del gen de la proteína E.	49
Tabla 4.6: Sustitución y conservación de aminoácidos observadas en la proteína de la Envoltura del DENV1 detectado en Paraguay.....	51

ABREVIATURAS

ADE	del inglés <i>Antibody dependent enhancement</i>
ARN	Ácido ribonucleico
DENCO	Dengue control
DENV	Virus del dengue
ELISA	del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FD	Fiebre del dengue
FHD	Fiebre hemorrágica del dengue
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
MAC- ELISA	del inglés <i>M Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
NS-1	del inglés <i>Nonstructural Protein 1</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>
prM	Proteína de membrana
PRNT	del inglés <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
RE	Retículo endoplásmico
RT- PCR	del inglés <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCD	Síndrome de choque por dengue
SLEV	Virus de la encefalitis de San Luis
UTR	del inglés <i>Untranslated region</i>
WNV	Virus del Nilo Occidental
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus del Zika

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dengue. Enfermedad. Generalidades

Los arbovirus, o virus transmitidos por artrópodos (*Arthropod-borne viruses*), son considerados importantes agentes causales de enfermedades humanas en todo el mundo, entre ellos se puede mencionar al virus del dengue (DENV), un virus perteneciente al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (1–4).

El dengue es una enfermedad viral infecciosa sistemática causada por el DENV, que presenta cuatro tipos antigénicamente relacionados (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), de carácter epidémico-endémico y es transmitido por mosquitos vectores del género *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en menor proporción). En la actualidad es considerada como la arbovirosis de gran impacto mundialmente en términos de morbilidad y mortalidad (5).

Se han reportado casos de dengue en unos cien países, con mayor riesgo las áreas tropicales y subtropicales. En el 2013 fue reportada una “incidencia” de 58.4 millones (23.6 millones–121.9 millones) de casos aparentes; además considerando la suma de los resultados fatales y no fatales, el dengue fue responsable de 1.14 millones (0.73 – 1.98 millones) de casos ajustados por discapacidad (6).

1.2 Breve historia

La primera descripción clínica precisa de fiebre del dengue (FD), fue hecha por el médico norteamericano *Benjamín Rush*, como “*fiebre rompehuesos*” en la epidemia ocurrida en Filadelfia, Pensilvania en 1780. El dengue fue la segunda enfermedad humana, después de la fiebre amarilla atribuida a “virus filtrable”, y la transmisión por mosquito vector fue demostrada mediante experimentos en voluntarios en 1903 (7).

El origen del término dengue describe a una enfermedad que presentó el clásico síndrome fiebre-artralgia-exantema, y que provocaba intensos dolores articulares, erupciones y calambres, que afectó a países del Caribe entre 1827 y 1828. Los esclavos provenientes de África, identificaron a esta entidad patológica como *dinga* o *dyenga*, de la voz Swahili (idioma del este de África) “*ki denga pepo*” que significaba “un tipo de ataque repentino por espíritu maligno” (8).

Durante el siglo XX, el área geográfica afectada por dengue había tenido un incremento. Su propagación desde la Segunda Guerra Mundial tuvo un incremento drástico relacionado con la re-emergencia de la enfermedad y la transmisión por el mosquito *Aedes aegypti*, además del pobre control en campo de refugiados, como en la población urbana, y el aumento de viajes por todo el mundo (7).

1.3 Clasificación. Tipos. Fases de Evolución. Manifestaciones Clínicas

La enfermedad puede presentarse desde formas las asintomáticas y con variaciones en cuanto a severidad de la manifestaciones. La OMS ha propuesto anteriormente la clasificación de dengue en: fiebre del dengue (FD) o dengue clásico, fiebre hemorrágica por dengue (FHD) con o sin síndrome de choque por dengue (SCD). Ante los cuestionamientos y las dificultades para clasificarlos como tales, se realizó el estudio internacional DENCO (Dengue Control), cuyo objetivo principal era *obtener información de un número elevado de enfermos con dengue confirmado, encontrar una forma mejor de clasificarlos, e identificar cuáles serían los signos de alarma útiles para mejorar el protocolo de manejo de casos de dengue* (9). La OMS a través de varios consensos realizados, estableció en el 2008 (Ginebra, Suecia) que: “*el dengue es una sola enfermedad con presentaciones clínicas diferentes y a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles*”. Mediante los resultados obtenidos en el estudio se había propuesto la clasificación binaria de la enfermedad en: dengue y dengue severo. Pudiendo presentarse el dengue como: dengue con signos de alarma y dengue sin signos de alarma (10).

Generalmente el dengue se manifiesta con fiebre, artralgia, dolor retro-ocular, cefalea, exantema y mialgia, además pueden acompañar náuseas, vómitos y anorexia. Si algunos de estos se prolongaran podrían desarrollarse síntomas neurológicos (como fatiga y lasitud). Los cuadros de dengue pueden derivar a cuadros de dengue grave con las siguientes condiciones: extravasación de plasma con permeabilidad vascular que conduce a choque hipovolémico y distributivo (choque por dengue) con hemoconcentración y alteraciones en la homeostasis, acumulación de líquidos, con insuficiencia respiratoria o sin ella, o ambas; sangrado grave (diátesis hemorrágica) o deterioro de órganos grave, o ambos (10,11).

Posterior al periodo de incubación de la enfermedad, se pueden distinguir tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia con características y manifestaciones clínicas (Fig. 1.1).

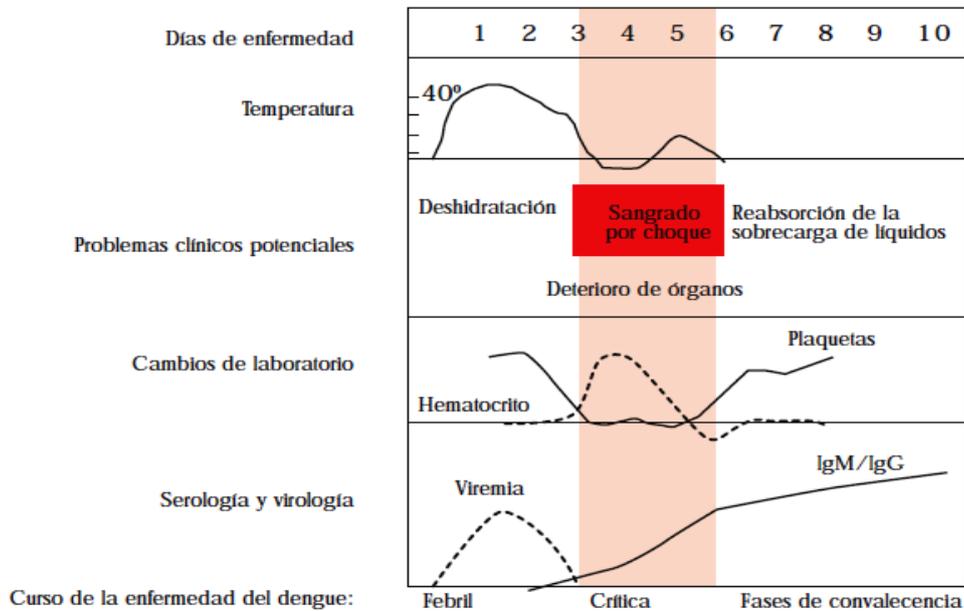


Figura 1.1: Curso de la enfermedad del dengue.

Fuente: adaptado de Yip Capítulo 2. OMS. Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Traducción española. OMS/OPS, La Paz, Bolivia. 2010 (12).

En la fase febril se evidencia deshidratación, fiebre elevada que puede causar trastornos neurológicos y convulsiones febriles en niños pequeños, además de reducción progresiva del recuento de glóbulos blancos. La fase crítica se caracteriza por choque a causa de la extravasación de plasma, leucopenia progresiva y disminución del número de plaquetas, además de hemorragia importante, y deterioro de órganos (con hepatitis, encefalitis o miocarditis). En la fase de convalecencia se observan pacientes con hipervolemia (sólo si la terapia de líquidos intravenosos ha sido prolongada), el hematocrito se estabiliza, aumento en el conteo de leucocitos, y recuperación del número de plaquetas (12,13).

1.4 Características estructurales y moleculares del virus del Dengue

La partícula viral del DENV tiene un diámetro aproximado de entre 40 a 60 nm y consta de un genoma de ARN (Ácido Ribonucleico) monocatenario de polaridad positiva de 10,7 kilobases (kb) (2). Posee un marco de lectura abierto (ORF; *Open Reading Frame*) que codifica para una sola poliproteína precursora que al ser procesada por las proteasas virales y las del huésped generan tres proteínas estructurales (C, de la cápside, prM/M, de la membrana y E, de la envoltura), y siete proteínas no estructurales (NS-1, NS-2A, NS-2B, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5); el ORF está flanqueado por dos regiones no codificantes (UTR; *Untranslated region*), el extremo 5' posee un *cap* y el extremo 3' que carece de cola poliadenilato, además forma un bucle (14).

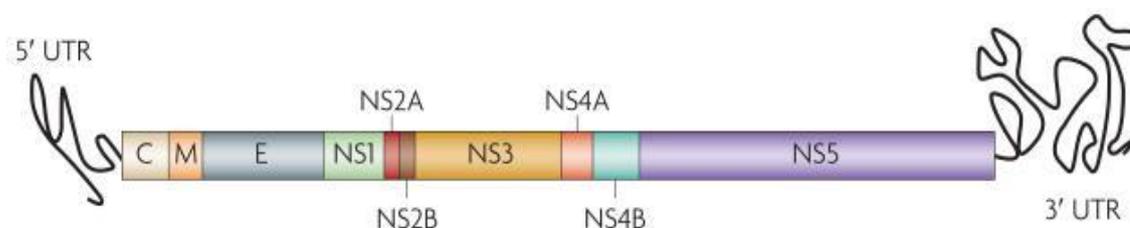


Figura 1.2: Estructura del genoma del virus del dengue.

El marco de lectura flanqueado por dos regiones no codificantes (5' UTR y 3' UTR), codifica para tres proteínas estructurales: cápside (C), membrana (prM/M) y envoltura (E), y siete proteínas no estructurales: (NS-1, NS-2A, NS-2B, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5). Fuente: Guzman, MG. Halstead, SB. Artsob. H. Buchy. P. Farrar, J. Nathan, MB et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:S7-16 (15).

El gen de la proteína E consta de 1485 pb y codifica para la proteína de la envoltura. Esta proteína está compuesta de 495 aminoácidos y se encuentra en la superficie de la partícula viral. La misma constituye el mayor determinante de tropismo, pudiendo desencadenar respuesta inmune, además es la responsable de mediar la unión y fusión del virus a las células huésped. Esta proteína presenta tres dominios de gran conservación estructural: dominio I (de localización central con estructura β -barril), dominio II (contiene regiones de dimerización y péptido de fusión) y el dominio III (con actividad de unión a receptor de superficie celular), además consta de un tallo proximal a la membrana (*membrane-proximal stem*) y un ancla a transmembrana (*transmembrane anchor*) (Fig. 1.3) (16–18).

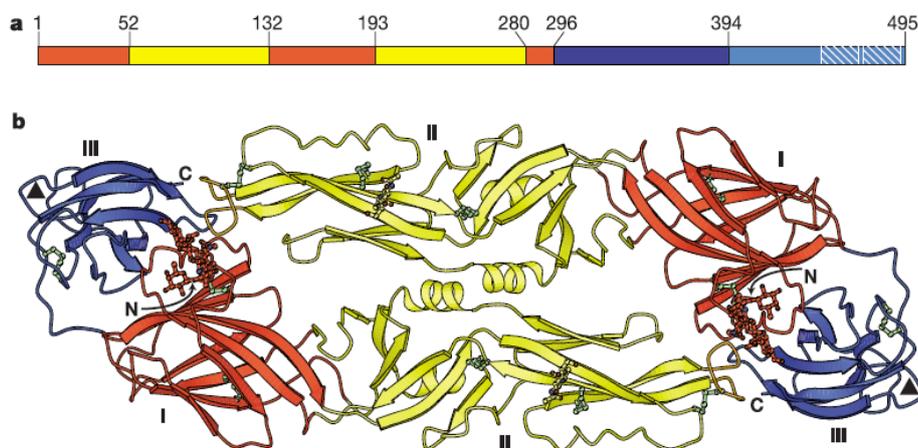


Figura 1.3: Estructura de la proteína de la Envoltura de DENV

Proteína E constituida por tres dominios: dominio I (Rojo), dominio II (Amarillo), dominio III (Azul). (a) Representación lineal de la proteína E constituida por 495 aminoácidos distribuidos en tres dominios (b) representación tridimensional del dimero de la proteína E. Fuente: Modis, Y. Ogata, S. Clements, D. Harrison, SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313–9 (17).

1.5 Ciclo de replicación del virus

El ciclo replicativo se inicia con el ingreso de la partícula viral a la célula huésped vía endocitosis mediada por receptor, en la que la entrada del virus al cuerpo es reconocida en primer lugar por las células dendríticas que se encuentran en la epidermis, por lo tanto estas son las primeras en infectarse con el virus (19,20). El desarrollo de la infección por dengue se inicia con la unión entre la glicoproteína E de la partícula viral y moléculas como el glicosaminoglicano heparan sulfato que componen los receptores de superficie de las células huésped. Dicha interacción se produce entre la lectina de unión a ICAM3, DC-SIGN o CD209 y los residuos de manosa de la Asn 67 de la proteína E (21,22).

Posterior a la internalización de las partículas virales, el endosoma se fusiona con el lisosoma y sufre una disminución de pH, la proteína E experimenta un reordenamiento conformacional debido a la reducción del pH, el cambio conformacional promueve la fusión de la membrana de la partícula viral con la membrana del endosoma liberando el RNA en el citoplasma. La traducción tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) generando la poliproteína viral que son procesadas por proteasas virales y del huésped,

dándose luego el proceso replicativo en el que se sintetiza la cadena negativa intermediaria que sirven como hebra molde para la producción de múltiples copias de RNA viral de polaridad positiva, las cuales son ensamblados en los viriones pasando por varias etapas desde la partícula inmadura hasta ser secretados (Fig. 1.4) (20,23).

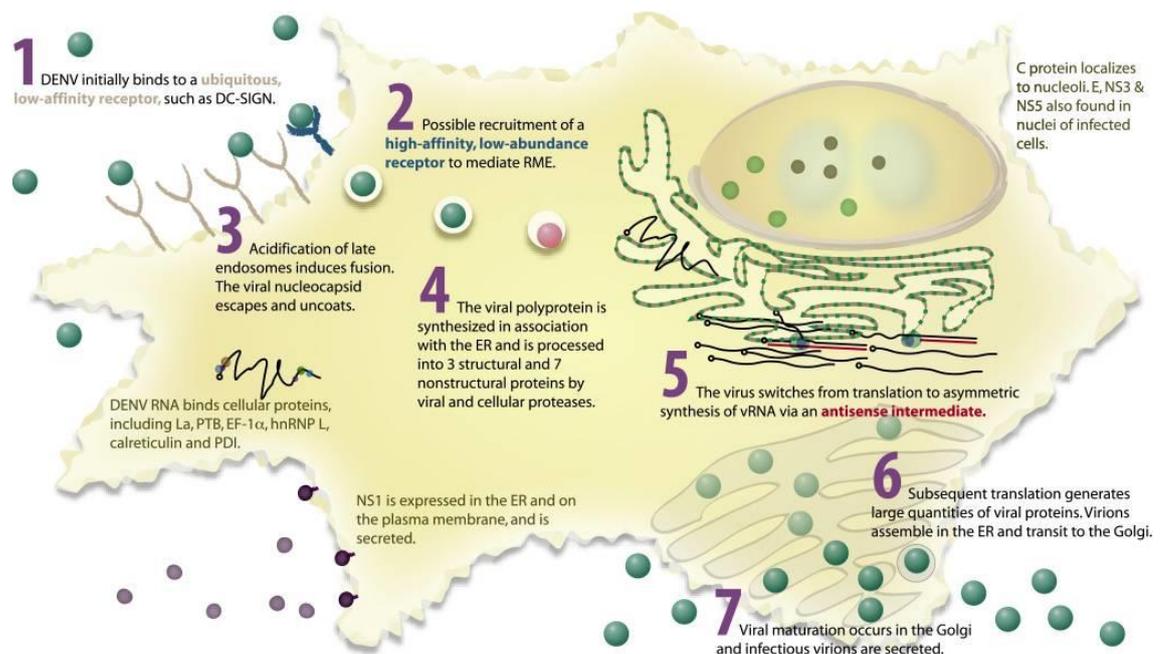


Figura 1.4: Ciclo de replicación del DENV.

(1) El virus es reconocido y capturado (2) endocitosis del virus mediado por receptor (3) fusión con lisosoma, disminución del pH, reordenamiento estructural de la proteína E y liberación del RNA en el citoplasma (4) síntesis de la poliproteína en el RE (5) síntesis de RNA viral a partir de un RNA de cadena negativa (6) ensamblaje del virión en el RE y tránsito por el Golgi (7) maduración del virus y liberación. Fuente: Clyde, K. Kyle, J. Harris, E. Recent advances in deciphering viral host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. Minireview. Journal of virology. 2006; 80:11418-11431 (20).

La partícula viral inmadura posee un complemento precursor de proteína de membrana (prM) asociado a proteína E en proporción 1:1. En ambientes con pH neutro tal como el caso del lumen del RE, los viriones inmaduros despliegan una característica aparente de 60 espículas, cada uno de los cuales forman un heterohexámero (conocidos también como trímeros) a partir de tres proteínas prM y tres proteínas M (24,25).

La exposición a pH bajo en el Golgi conlleva a que estos trímeros se disocien en subunidades individuales y se reasocien como dímeros, mostrando una rejilla de 90 dímeros de proteína E. La prM se une a los dímeros E de interface convirtiendo el bucle de fusión y exponiendo el sitio de escisión a la proteasa furina del hospedador en la cara *trans*-Golgi. En las siguientes escisiones mediadas por furina existe pérdida de la mitad del precursor de prM, y las partículas virales maduras son liberadas de las células por exocitosis (17).

Los virus que contienen una gran cantidad de prM no son infecciosos, mientras que aquellos que presentan bajos niveles de prM sigue siendo infecciosos, además fue postulado que la partículas virales no-infectiva con una gran cantidad de prM puede generar una infección por mecanismo ADE (26).

1.6 Transmisión por vectores

El DENV puede desarrollarse tanto en los ecotipos selváticos como en los urbanos-endémicos, a este proceso se lo denominan ciclo en el que se distingue dos ciclos de desarrollo característico y diferenciado: el selvático y el humano, además existe una zona intermedia donde emergen ambos ciclos. El ciclo selvático fue descrito en primates que actuaban como exclusivos huéspedes amplificadores del virus en regiones selváticas en el oeste de África y el sudeste de Asia. Entre los vectores se encuentran *Ae. (Stegomyia) luteocephalu*, *Ae. (Diceromyia) furcifer*, *Ae. (Diceromyia) taylori* (Fig. 1.5) (27,28).

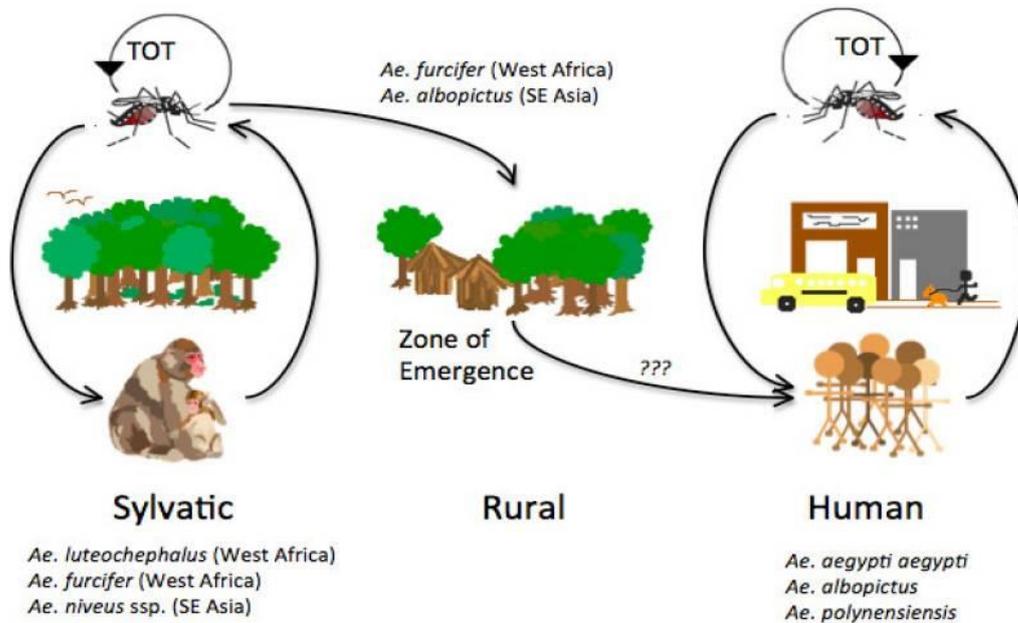


Figura 1.5: Ciclo de transmisión del DENV.

Se describen un ciclo selvático, un ciclo humano y una zona de emergencia donde ambos ciclos interaccionan (28). Fuente: Chen R, Vasilakis N. Dengue-quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011 Sep; 3(9):1562-608.

La mayor parte de las infecciones humanas son causadas por cualquiera de los cuatro tipos del DENV que circulan en áreas urbanas, espacios domésticos y peridomésticos, siendo el humano el único amplificador del virus. La enfermedad es transmitida por la picadura del mosquito vector *Aedes aegypti* infectado con el DENV, también se han atribuido otros brotes por *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y varias especies relacionadas como el complejo *Aedes scutellaris* (12,28).

1.7 Inmunopatogenia

La entrada del virus al cuerpo se produce por picadura del mosquito infectado, y posterior de su ingreso a la célula dendrítica de la piel o células de Langerhans, estas se activan, procesan antígeno y presenta epítomos del virus a las células T. Así mismo, estos virus pueden alcanzar el torrente sanguíneo diseminándose por todo el cuerpo, siendo identificados por los monocitos que se transforman en macrófago y presentan antígenos. Uno de los mecanismos intervinientes es respuesta inmunitaria mediada por célula, donde la primera activación se produce en linfocitos T CD4 que por liberación de citoquinas activan luego a los linfocitos T CD8 (29,30).

Las respuestas inmune generadas pueden ser protectoras con memoria de por vida contra el tipo infectante, o tener efectos adversos que pueden desencadenar la muerte, como ocurre en el caso de la sobreproducción de citoquinas, el cambio de perfil de TH₁ a TH₂, o bien alteración en el índice CD4/CD8 (31).

Uno de los fenómenos característicos en la enfermedad del dengue es el aumento de la permeabilidad vascular relacionada con el exceso de secreción de citoquinas, que desencadena la extravasación del plasma con pasaje de agua y proteína al espacio extravascular y conlleva a generar cuadros de hemoconcentración y en algunas ocasiones hasta choque hipovolémico (32,33).

Existen evidencias epidemiológicas que el dengue severo pueda ocurrir durante una infección secundaria (con un tipo distinto) que durante la infección primaria con DENV. La respuesta exacerbada dependiente de anticuerpos (*Antibody-dependent enhancement*, ADE) ha sido propuesto como mecanismo para explicar el incremento de la severidad vista en infecciones secundarias, debido a que no se presenta inmunidad cruzada con otros tipos a excepción de la primeras semanas o durante los primeros meses de la infección (34). Esta hipótesis establece que los anticuerpos que se generan contra un tipo de DENV no tendrán suficiente avidéz o concentración para neutralizar un tipo secundario, pero podrá opsonizar el virus. Estos virus opsonizados pueden ser reconocidos, y su entrada a los monocitos o macrófagos es favorecida a través la respuesta mediada por receptores Fc, lo cual conduce a potenciar la infección y aumentar la carga viral (35). El reconocimiento de las partículas de DENV por los anticuerpos se dificulta debido a las distintas composiciones y conformaciones de las glicoproteínas de la cápside del virus, los cuales se despliegan en distintas conformaciones durante las fases del ciclo de vida del virus (24,36).

Durante los primeros días en el transcurso de la infección el virus es capaz de inducir apoptosis de grandes cantidades de linfocitos T, presentando el paciente problemas inmunitarios temporales, además de afectar a distintas células como los hepatocitos, neuronas, miocardiocitos conllevando a falla en los órganos relacionados (37).

Los cuadros característicos de trombocitopenia atañen con mecanismos inmuno-mediados, sin embargo los sangrados no siempre se deben a este cuadro, ya que son de una etiología multifactorial (38).

1.8 Clasificación genotípica

En la actualidad se ha logrado diferenciar 4 tipos circulantes distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los errores en la replicación del genoma son inherentes, y dan como resultado una amplia diversidad genética dentro de cada uno de los cuatro tipos de DENV, tanto a nivel del huésped (*intra-host*) como entre ellos (39–41). Si bien se tratan del mismo virus, presentan variaciones antigénicas importantes relacionadas a la composición de los aminoácidos, los cuales difieren en un 25 a 40% (41,42). La diversidad de tipos a menudo se divide en grupos filogenéticamente discretos de secuencias denominadas genotipos, correspondientes grupos de cepas de DENV con hasta 6% de divergencia de secuencia a nivel de nucleótidos (42–44). Cada tipo está compuesto por varios genotipos, que probablemente representan los resultados de la evolución independiente después del aislamiento geográfico (44–46).

DENV-1

Mediante estudios filogénicos del gen de la proteína E, así como la secuencia genómica completa se ha logrado identificar cinco genotipos distintos del DENV-1. El genotipo I está compuesto por cepas de todo el Sudeste de Asia, China y Oriente Medio (Arabia Saudí) relacionada con la expansión epidemiológica en estas zonas, el genotipo II comprende algunas cepas de Tailandia, se cree que esta cepa podría estar extinta o circular con muy bajas frecuencia, el genotipo III incluyen cepas selváticas aisladas en Malasia, el genotipo IV está representado por cepas de Japón, Corea, China, Myanmar, Malasia e Indonesia, Islas del Pacífico Este (Polinesia Francesa, Nauru, Filipinas y Hawaii) y de Australia, y el genotipo V conformado por cepas colectadas en las Américas, el este de África y Asia (47,48).

DENV-2

Los estudios filogénicos para el DENV-2 anteriormente habían identificado cuatro genotipos basándose en secuencias parciales (prM/E) o secuencias completas del gen de la proteína E, posteriormente fueron descritos dos nuevos genotipos. En el genotipo asiático I se agrupa cepas de Tailandia, Malasia, Camboya, Myanmar, Vietnam y Australia. El genotipo asiático II es representado por cepas de China, Indonesia, Filipinas, Taiwán, Sri Lanka, India, Honduras y México. El genotipo del Sudeste de Asia y América comprende cepas del Sudeste asiático, del Centro y Sur de América y el Caribe colectadas durante los últimos treinta años. El genotipo cosmopolita incluye cepas distribuidas en área comprendidas en el Este y Oeste de África, Oriente Medio, India, Islas del Pacífico y Australia. El genotipo Americano está conformado por cepas del Centro y Sur de América, el Caribe y otras cepas aisladas en el subcontinente indio e islas del Pacífico. El genotipo selvático está constituido por cepas humanas, de mosquitos y primates colectados en el Oeste de África y el Sudeste asiático (28,49,50).

DENV-3

Los cuatro genotipos del DENV-3 fueron descritos por primera vez por *Lanciotti* y col. en 1994, estudios del genoma completo han demostrado la misma distribución de genotipos. El genotipo I representado por cepas del Sudeste asiático, Filipinas y las Islas del Pacífico Sur; el genotipo II, compuesto por cepas del Sudeste asiático; el genotipo III conformado por cepas que se propagan por el Asia, África del Este y en las Américas y el genotipo IV representado por cepas de Puerto Rico y Tahití (51–54).

DENV-4

Para el DENV-4 fueron identificados cuatro genotipos. En el genotipo I se encuentran cepas de Filipinas, Tailandia, Vietnam, Myanmar, Malasia, Sri Lanka, India, Japón, China y cepas aisladas en Brasil. En este genotipo incluye el prototipo de DENV-4 (H241) que fue aislado en Filipinas en 1956. El genotipo II conforman cepas de todo el sudeste asiático (Indonesia, Malasia, Singapur), China, islas del Oeste del Océano Pacífico, Australia, el Caribe y las Américas. El genotipo III en el que están cepas de Tailandia aisladas entre 1997 y 2001. El genotipo IV incluye las tres cepas aisladas de monos centinelas en Malasia durante la década de 1970, se tratan de cepas distintas

genéticamente en relación a las cepas mencionadas con anterioridad y se lo describen como el genotipo ancestral (55–57).

Tabla 1.1: Distribución geográfica mundial de los genotipos de DENV

Tipo	Genotipo: nomenclatura de Holmes y Twiddy (Grupo)	Genotipo: nomenclatura de Rico-Hesse (Ubicación geográfica principal)
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Este de África
	II	Tailandia
	II	Cepas selváticas aisladas en Malasia
	IV	Islas del oeste del Pacífico y Australia
	V	América, Oeste de África y algunas Asiáticas
DENV-2	Americano	América Latina, Caribe, India e islas del Pacífico
	Asiático 1	Malasia y Tailandia
	Asiático 2	Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas
	Americano/Asiático	Tailandia, Vietnam, América
	Cosmopolita	Amplia distribución
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Caribe, India e Islas del Pacífico
	II	Tailandia, Vietnam, Bangladesh
	II	Sri Lanka, África, India, Samoa
	IV	Puerto Rico, América central, América Latina, Tahití
DENV-4	I	Tailandia, Sri Lanka, Filipinas, Japón
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Caribe, América
	II	Tailandia
	IV	Selváticas

Dentro de cada genotipo ha sido indicada la existencia de “*grupos*”, “*clados*” o “*linajes*” con características diferenciales en cuanto a tiempo y distribución geográfica.

Las principales utilidades de los estudios filogénicos del DENV son los cambios, reemplazo o extinción de los clados.

1.9 Diagnóstico

A. Aislamiento viral: es el “estándar de oro” para el diagnóstico de DENV, generalmente son aislados por cultivo celular (58,59). El cultivo celular se trata de uno de los métodos más utilizados, se emplean líneas celulares de mosquito C6/36 (células clonadas de *Aedes albopictus*) o bien AP61 (línea celular de *Aedes pseudoscutellaris*). Pueden ser utilizados suero, plasma, células mononucleares de sangre periférica, así también se puede recuperarlos de tejidos afectados obtenidos por autopsia (médula ósea,

pulmón, hígado, ganglios linfáticos). El efecto citopático es observado entre cinco a siete días después de la incubación (12,60).

B. Serología

a. **MAC ELISA:** se basa en el principio de captura de anticuerpos de tipo IgM, en el cual el IgM total, que se encuentra presente en la muestra de los pacientes con infección, es capturado por otros anticuerpos específicos dirigidos contra la cadena de esta IgM (anticuerpo anti-cadena de IgM humana) cuya función es inmovilizar a IgM. Los antígenos de cualquiera de los cuatro tipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) son captados por los anticuerpos IgM específicos contra estos, y finalmente detectados ya sea por anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con una enzima que genera una sustancia coloreada a partir de un sustrato sin color, cuya densidad óptica es medida por espectrofotómetro. Esta densidad óptica es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo de tipo IgM específicos contra antígenos de DENV que se encuentra en la muestra.

La sensibilidad y especificidad de esta prueba se limita para muestras que son tomadas a partir de los cinco o más días posteriores a la aparición de la fiebre, por otra parte tampoco es capaz de diferenciar entre los distintos tipos del DENV (61).

b. **IgG ELISA:** es utilizada para detección de anticuerpos tipo IgG en caso de infecciones por dengue ya sean primarias o secundarias. La prueba de ELISA de captura de IgG (GAC) tiene especificidad hacia la envoltura y la membrana viral, y con ello alcanza detectar anticuerpos IgG hasta 10 meses posterior a la infección, sin embargo es importante reconocer que estos anticuerpos tienen duración para toda la vida. Por otra parte, también fueron desarrollados métodos de inhibición de ELISA (EIM) que se fundamenta en la competencia por los sitios antigénicos entre los anticuerpos IgG de la muestra del paciente y la IgG anti-dengue conjugado (62,63).

Una de las limitaciones que presenta esta prueba es la carencia de especificidad contra los *flavivirus*, pues no es capaz de diferenciarlos. En algunos laboratorios son detectadas la avidéz de los anticuerpos para diferenciar entre una infección primaria y una secundaria (10).

c. Captura de antígeno NS1: se basa en la detección de la proteína antigénica NS1 por técnica de ELISA. La NS1 es una glicoproteína de 55 kDa, que es producida por todos los flavivirus y secretadas por las células infectadas, característico en pacientes con viremia y etapa febril de la enfermedad. Puede detectarse desde el primer día de la aparición de síntomas febriles hasta los 7 a 9 días donde pueden formarse complejos inmunes que afectan su detección. Presenta gran utilidad en la detección temprana de la enfermedad (64). Estudios conjuntos posteriores realizados en el 2010 ensayaron dos prueba de ELISA para detección de NS-1, llegando a la conclusión que puede aumentarse la sensibilidad diagnóstica para dengue si se combinan la detección de NS1 e IgM (65).

d. PRNT (*Plaque reduction neutralization test*) Prueba de neutralización por reducción de placas: es una prueba útil para medir el título de anticuerpos neutralizantes en el suero del individuo infectado, midiendo el grado de protección contra el virus infectante, como por ejemplo en el caso de desarrollo de vacunas. La prueba se fundamenta en la capacidad neutralizante de los anticuerpos contra los virus, perdiendo estos su capacidad infectiva contra determinadas células; es considerado como estándar de oro para determinar el nivel de protección por inmunidad humoral (66,67).

C. Detección de ácidos nucleicos: fueron desarrolladas numerosas pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), cuya sensibilidad es mucho mayor comparadas con las del cultivo celular.

Con el transcurso del tiempo también se desarrollaron RT-PCR en tiempo real, y entre sus principales ventajas cabe mencionar la sensibilidad alta, el menor tiempo para el análisis, riesgo bajo de contaminación con productos amplificados, además permite cuantificar la carga viral en tiempo real. Para dichos fines deben ser utilizados sondas que emitan fluorescencia captada por el equipo como señal, entre estos se mencionan los agentes intercalantes de ADN como el SYBR® Green, o bien sondas TaqMan® de gran especificidad por su capacidad de hibridar con una secuencia específica (68,69).

Más tarde fueron desarrollados RT-PCR en tiempo real “multiplex” capaces de detectar los cuatro tipos de DENV en una misma reacción (70,71).

1.9.1 Reacción cruzada

Las infecciones causada por arbovirus como el virus del dengue se evidencian principalmente mediante detección de una secuencia específica del genoma viral o anticuerpos neutralizantes o inmunoglobulinas específicas de tipo IgM/IgG para determinados epítomos. Sin embargo, existen suficientes evidencias que señalan la posibilidad que se produzca reactividad serológica cruzada. Debido a la co-circulación de DENV y ZIKV, el impacto de la respuesta inmune contra uno de estos virus afectará en el otro. Existe suficiente evidencia que los individuos que padecieron infección por DENV generaron reacción cruzada con ZIKV produciendo respuesta tipo ADE (72–74).

Es de suma importancia tener en cuenta que la sintomatología descrita en estas arbovirosis presenta gran similitud por lo que el diagnóstico basado en la clínica se torna difícil, además los análisis serológicos tampoco son concluyentes.

1.10 Epidemiología

1.10.1 Situación en América

Los primeros casos de enfermedad del Dengue en América se remontan a la década del 60 en el que se realizó una extensa campaña de erradicación del *Ae. aegypti* logrando eliminar la transmisión durante aproximadamente 10 años (1,75).

Los reportes oficiales de fiebre por dengue (FD) se dieron en Cuba en la epidemia comprendida entre los años 1977 y 1978 causada por DENV-1, y más tarde la gran epidemia de Fiebre hemorrágica del dengue (FHD) en 1981 que fue causada por DENV-2 (76).

Las epidemias que se dieron en varios países del Caribe entre los años 1962 y 1963 fueron causadas por el DENV-3. Posteriormente en el año 1994, este tipo nuevamente re-ingresó causando las epidemias de Panamá y Nicaragua, propagándose a los países de América Central México, llegando luego a los países de Sudamérica. El ingreso del DENV-4 se produjo en el año 1981 causando epidemia en México, el Caribe, América Central y del Sur (77).

En el periodo comprendido entre el 2001 y 2009, un 75% de la mayoría de los casos era representado solo por seis países de la región: Brasil, Colombia, Costa Rica, Honduras, México y Venezuela. En el 2011, en la mayoría de los países de este continente fueron reportados más de un millón de casos de FD, con número aproximado de 18.000 casos de dengue severos y 716 muertes, confirmándose la circulación de los cuatro tipos del virus (9,12).

1.10.2 Situación en el Paraguay

En el Paraguay se han reportado varias epidemias de Dengue, desde el ingreso del virus entre 1988 y 1989 fueron registrados 41.990 casos atribuidos a DENV-1. La segunda epidemia se produjo en 1999 continuando hasta el 2000 con 24.282 casos a DENV-1. Por primera vez en el año 2001 fue registrada la circulación del DENV-2 (78–80).

En el año 2002 ingresó el DENV-3 registrándose un número estimado de 1800 casos. El tercer brote epidemiológico tuvo inicio en el año 2006, con 1700 casos de dengue a DENV-3 solo en la zona de Asunción, y en el 2007 se reportaron 28.182 casos (55 correspondiente a dengue grave y 17 muertes por esta patología) (79).

Desde el año 2009, el DENV ha circulado continuamente en el país pese a las numerosas campañas de luchas contra el vector. En el 2011 fueron notificados 42.264 casos confirmados, de los cuales 97 correspondieron a dengue grave y se registraron 62 muertes, con una cocirculación de DENV-1 y DENV-2. En el 2012 por primera vez se produjo el ingreso del DENV-4, confirmándose de este modo la circulación de los cuatro tipos en el país (81).

En el año 2015 fueron confirmados 16.739 casos de dengue con circulación simultánea de DENV-1, DENV-2 y DENV-4, por otra parte fueron notificados 3 casos de confección (DENV y CHIKV) (82).

Hasta el año 2018 han sido reportadas la circulación predominante de DENV-1 constituyéndose el tipo predominante circulante en el país. De acuerdo con las notificaciones realizadas durante los últimos años el número de casos reportados en el Departamento Central representa al 2/3 de los casos de dengue descriptos en el Paraguay (83–85).

1.11 Impacto

En un área geográfica dada, aparecen variantes virales individuales a nivel de secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas que circulan por un período de tiempo y luego desaparecen, generalmente para ser reemplazadas por otro conjunto de variantes. Este fenómeno se ha denominado "reemplazo de clado", y en ocasiones está relacionado con cambios en la virulencia (45,46,86,87).

El reemplazo también puede ocurrir a nivel de tipos, con tales eventos reportados para los cuatro tipos que circulan globalmente cada 3–5 años en promedio (88–90). Se cree que estos cambios en el dominio dentro de una población humana son en gran parte el resultado de la susceptibilidad diferencial de la inmunidad a nivel de reacción cruzada de los tipos individuales (91). A pesar del vínculo entre la infección posterior o secundaria heterotípica y la enfermedad grave, los factores virales y naturales que podrían dar explicación al dominio, siguen siendo poco conocidas (39).

Recientemente se ha confirmado que los pacientes pueden infectarse por segunda vez con el mismo tipo de DENV (92). Esto probablemente impacta en la persistencia de la circulación viral en una población. Sin embargo, todavía no están claros los factores virales que hacen posible la ocurrencia de re-infecciones. Existe evidencia en la literatura que los cambios a nivel genómico influyen directamente en cambios antigénicos dotando al virus la capacidad de persistir en un periodo de tiempo en una determinada área geográfica (93).

Por lo tanto mediante el estudio de los cambios genéticos y a nivel de secuencia de aminoácidos presentados por el DENV-1 en un área geográfica y tiempo determinado son fundamentales para comprender las variaciones antigénicas presentadas por este virus con el transcurso del tiempo lo cual le confiere persistencia en infecciones durante varios años de manera sostenida y consecutiva.

1.12 Justificación

En países endémicos para el dengue, fue demostrada la ocurrencia de reemplazos de los tipos de DENV o genotipos, así también reemplazos de grupos o clados dentro de los genotipos (86,94). Por otro lado, estudios previos han indicado la asociación entre los mencionados reemplazos y cambios en la incidencia de la enfermedad o persistencia de los mismos (94,95).

Estudios filogenéticos de aislados de DENV en Paraguay sugieren que el reemplazo de genotipos circulantes de DENV-2 dio lugar a su predominancia sobre DENV-3 en 2005 y un cambio de genotipo de DENV-3 produjo el reemplazo de DENV-2 como tipo predominante en 2006 (96,97). Sin embargo, a pesar de la persistencia de la circulación de DENV-1 en Paraguay se cuentan con pocos estudios acerca de este tipo de DENV en nuestro país.

El Departamento Central con 2.158.215 habitantes hasta el 2019 representa el departamento más poblado (35% de la población del país). De acuerdo con los datos reportados por la Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS), la región de estudio representa el 2/3 de los casos de dengue descritos en el Paraguay hasta el año 2018 (83–85).

Considerando la alta tasa de sustituciones de la proteína E de DENV, estimada entre 5×10^{-4} a $6,56 \times 10^{-4}$ sustituciones por sitio por año (16,98,99), la región codificante de esta proteína ha sido propuesta como un blanco útil para la genotipificación de todos los tipos de DENV (17,43). En este trabajo se propuso obtener la secuencia completa del gen E de DENV-1 a partir de muestras de suero de pacientes con dengue en Asunción y el Departamento Central de Paraguay en el período 2011 a 2019. Se llevó a cabo el análisis filogenético de estas secuencias y su relación con cepas circulantes previamente en Paraguay y alrededor del mundo. Con este estudio se buscó aportar conocimientos acerca de la dinámica de DENV-1 circulante en nuestro país en el periodo de tiempo mencionado. Además, se analizó la secuencia de aminoácidos inferida y se mapearon los sitios de variación en la estructura deducida de la proteína E. Estos análisis permitirían conocer sobre la influencia que pudiera tener la variación de este gen en la circulación persistente de este tipo de DENV en una región de Paraguay.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar la variabilidad genética del virus del dengue tipo 1 (DENV-1) causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Departamento Central del Paraguay.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la variabilidad genética mediante el análisis de secuencias nucleotídicas del gen que codifica la proteína E del DENV-1 causante de infecciones humanas entre 2011 y 2019 en el Dpto. Central, Paraguay.
- Analizar el relacionamiento filogenético de las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína E de DENV-1 obtenidas en el estudio con el DENV-1 detectado en Paraguay en años anteriores y con el DENV-1 reportado en otros países.
- Describir la variabilidad aminoacídica de la proteína E de DENV-1 mediante el análisis de las secuencias de aminoácidos obtenidas en el estudio y mapear los sitios de variación.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de corte transverso. El muestreo fue del tipo no probabilístico por conveniencia. Fueron seleccionadas muestras positivas para la presencia de RNA de DENV por rRT-PCR procedentes de la seroteca del Departamento de Producción del IICS correspondientes a casos de infecciones humanas entre los años 2011 y 2019. Estas muestras consistieron en sueros o virus aislados en cultivo celular a partir de sueros de pacientes con dengue. Las muestras fueron colectadas en el marco del Proyecto Marco “*Detección y caracterización de infecciones causadas por arbovirus en pacientes con enfermedad aguda del Departamento Central*” (con aprobación del CC y CE IICS-UNA P39/2018; Aprobación de la Universidad de Emory IRB00097089; Anexo1-2). El presente trabajo cuenta con la Aprobación de los Comités Científico y Ético del IICS-UNA (P13-2019) (Anexo 3).

3.2 Población de estudio

Las muestras empleadas para el presente estudio consistieron en muestras de pacientes con resultados positivos para la presencia de DENV colectados entre los años 2011 a 2019 que se encontraban almacenadas a -80°C en el Biobanco del Departamento de Producción, IICS-UNA. Se utilizaron sueros de pacientes, excepto para las muestras correspondientes al 2011 las cuales consistieron en aislados de DENV-1 obtenidos a partir de suero de pacientes. Estos aislados virales correspondieron a sobrenadantes de cultivo de células de *Aedes albopictus* C6/36 hasta dos pasajes, suplementado con 20% de SFB que se encontraban conservados a -80°C .

3.3 Controles

Como control negativo, en cada corrida fue empleada agua libre de nucleasas (DNAsa/RNAsa) y/o suero de pacientes sanos que fueron extraídas en las mismas condiciones que aquellas que tenían sospecha clínica de dengue.

Como controles positivos fueron utilizadas cepas virales y ácidos nucleicos sintéticos (*IDT, EUA*) correspondientes a las secuencias diana de las reacciones de rRT-PCR para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, estos fueron donados por el División de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina, Escuela de Medicina de la Universidad de Emory, EUA (Anexo 4).

3.4 Extracción de ARN viral

La extracción de ARN viral fue realizada a partir del suero de pacientes con sospecha clínica de dengue, o aquellos con resultados positivos para DENV en estudios anteriores, así como del sobrenadante de cultivo de células C6/36 (asilados virales) para el posterior análisis por rRT-PCR. La extracción del ácido nucleico se llevó a cabo utilizando el kit de extracción QIAamp Viral RNA Mini Kit (*Qiagen; Valencia, CA, EUA*). El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN viral fue purificado a partir de 140 µL de suero y del sobrenadante de cultivo celular, fue eluído con 60 µL de buffer de elución y finalmente almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

3.5 Detección de genomas virales mediante RT-PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se basa en la medición de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas (sondas *TaqMan*) con un fluoróforo en el extremo 5' y una molécula que bloquea la emisión de fluorescencia en el extremo 3' (en inglés «*quencher*»); esta sonda marcada hibrida de manera específica a una secuencia diana en la región central del producto de PCR. En el momento en que la polimerasa con actividad exonucleasa 5'→3' se encuentra con la sonda, la hidroliza, separando el *quencher* del fluoróforo emitiendo inmediatamente fluorescencia la cual es detectada y cuantificada por un sistema de detección a medida que transcurre la reacción (100).

La reacción de rRT-PCR fue realizada a fin de detectar el genoma del DENV, CHIKV y ZIKV. La metodología empleada fue la reacción denominada “ZCD”, descrita previamente por Waggoner y col. (2016) (101). Se utilizó el kit de un solo paso: *SuperScript® III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)*, conjunto de cebadores (*primers*) y sondas *TaqMan* dirigidas contra “secuencias blanco” específicas para cada arbovirus (Anexos 5-6). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL conteniendo: 12,5 µL del reactivo *2X Reaction Mix* [0,4 mM de cada dNTP, 6mM MgSO₄], 0,5 µL de las enzimas Retrotranscriptasa y ADN Polimerasa: *SuperScript™ III RT/Platinum® TaqMix*, 2 µL de la mezcla de *primers* y sondas y 5 µL de ARN.

La amplificación se realizó utilizando el instrumento “Rotor Gen-Q” (Qiagen; Valencia, CA, EUA) en las siguientes condiciones: 52°C por 15 min (paso de transcripción reversa), 94°C por 2 minutos; seguidamente de 45 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 40 segundos y 68°C por 20 segundos. Fueron incluidos controles positivos y negativos en cada corrida.

Se consideró positiva la detección si la curva de amplificación cruzó la línea umbral o “*threshold*” antes del ciclo 40 (Ct<40) (102). Cualquier resultado posterior al ciclo 40 fue evaluado individualmente. El valor de Ct se define como la cantidad de ciclos de PCR requeridos para la detección de 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.

3.6 Control interno RNasa-P

La RNasa P es una ribonucleoproteína compuesta por ARN y proteína, se trata de una endonucleasa que se encuentra principalmente en organismos eucariotas y en muestras biológicas (103).

Las muestras que resultaron negativas en la reacción ZCD fueron posteriormente ensayadas para evaluar la presencia de RNasa P como control interno de extracción de RNA. La metodología empleada fue descrita previamente por Waggoner y col. (2013) (102). Para la reacción se utilizó el kit de un solo paso *SuperScript® III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conjunto de cebadores y sonda *TaqMan* específicas (Anexo 7). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL conteniendo: 12,5 µL del reactivo *2X Reaction Mix* [0,4 mM de cada dNTP, 6mM MgSO₄], 0,5 µL de las enzimas Retrotranscriptasa y ADN polimerasa: *SuperScript™ III RT/Platinum® TaqMix*, 2 µL de la mezcla de *primers* y sondas (las concentraciones de cada componente son detalladas en el Anexo 7) y 5 µL de ARN purificado. La amplificación se realizó utilizando el instrumento “Rotor Gen Q” (Qiagen; Valencia, CA, EUA) en las siguientes condiciones: 52°C por 15 min (paso de transcripción reversa), 94°C por 2 minutos; seguidamente de 45 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 40 segundos y 68°C por 20 segundos.

Se consideró como detección positiva de RNasa P si la curva de amplificación cruzó la línea umbral antes del ciclo 30 ($Ct < 30$) (102). Las muestras negativas para ZCD y positivas para RNasa P fueron consideradas como verdaderas negativas, indicando ausencia de los genomas de los virus estudiados.

En los casos en los que no se detectó RNasa P se consideraron como casos de posibles fallas en la extracción de ácidos nucleicos o probable presencia de alguna sustancia inhibidora de la reacción de rRT-PCR, por lo que estas muestras volvieron a ser extraídas.

3.7 Tipificación de muestras positivas para DENV mediante RT-PCR en tiempo real

Las muestras positivas para el DENV fueron tipificadas mediante la reacción de detección, cuantificación y tipificación descrita previamente por Waggoner y col. (71). Para la reacción se utilizó el kit de un solo paso *SuperScript® III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conjunto de cebadores y sonda *Molecular Beacons* específicas (Anexos 8-9). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L conteniendo: 12,5 μ L del reactivo *2X Reaction Mix* [0,4 mM de cada dNTP, 6mM $MgSO_4$], 0,5 μ L de las enzimas Retrotranscriptasa y ADN polimerasa: *SuperScript™ III RT/Platinum® TaqMix*, 2 μ L de la mezcla de *primers* y sondas (las concentraciones de cada componente son detalladas en el Anexo 8 y 9) y 5 μ L de ARN purificado. La amplificación se realizó utilizando el instrumento “*Rotor Gen-Q*” (Qiagen; Valencia, CA, EUA) en las siguientes condiciones: 52°C por 15 min (paso de transcripción reversa), 94°C por 2 minutos; seguidamente de 45 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 40 segundos, 60°C por 20 segundos y 68°C por 20 segundos.

Las sondas *Molecular Beacons* son utilizadas por su alta sensibilidad y capacidad para diferenciar secuencias que difieren en tan solo una o dos bases (71).

3.8 Cálculo para cuantificación de carga viral

Se construyeron curvas estándares mediante la detección por rRT-PCR de diluciones de controles positivos para DENV1-2-3-4 de concentración conocida (expresada en escala logarítmica). Las mismas fueron obtenidas mediante el gráfico de los valores de Ct *versus* concentración, teniendo en cuenta que el valor de R^2 sea $\geq 0,99$. Utilizando los valores de Ct de muestras positivas para DENV-1 se estimó la concentración de RNA viral en las muestras (expresada en \log_{10} copias/ μ L). Para convertir estos valores en copias/ μ L se aplicó el antilogaritmo del resultado anterior.

Para estimar la concentración presente en la muestra se multiplicó la concentración en copias/ μ L por el volumen de elución utilizado en la extracción, y luego se dividió por el volumen de la muestra utilizado inicialmente para la extracción. Este resultado se multiplicó por 1000 para expresarlo como copias/mL de suero, además para fines prácticos la misma también puede expresarse como logaritmo de base 10.

3.9 Transcripción reversa

A partir del ARN extraído fue sintetizado ADN de cadena complementaria (ADN_C) en las muestras positivas para DENV-1, mediante el siguiente protocolo: la primera mezcla de reacción constaba de 2 μ L de cebadores aleatorios [50 ng/ μ L] (*random primers*) (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA*); 0,4 μ L de la mezcla de los cuatro dNTPs (desoxi-ribonucleótidos trifosfato) [25 mM] (*Promega, Promega Corporation, Madison, WI, EUA*); 2,6 μ L de agua libre de nucleasas a la que fue agregada 5 μ L de ARN viral, la misma fue calentada a 65°C por 5 minutos e introducido rápidamente en hielo por 15 minutos. Seguidamente fue añadida 10 μ L de la segunda mezcla de reacción conteniendo: 0,5 μ L de Transcriptasa reversa SuperScript® II Reverse Transcriptase [200 U/ μ L] (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*), 4 μ L de tampón 5X [250 mM Tris-HCl, (pH 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂], 2 μ L de DDT [0,1M], 1 μ L de inhibidor de Ribonucleasas Ribo-Lock [40 U/ μ L] (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) y 2,5 μ L de agua libre de nucleasas.

3.10 Amplificación del gen que codifica la Proteína E

Con la finalidad de amplificar el gen que codifica la proteína E se utilizó el kit de amplificación LongAmp® Hot Start *Taq* 2X Master Mix (*New England BioLabs® Inc., Ipswich, MA, EUA*) siguiendo las indicaciones del fabricante, y conjunto de cebadores específicos (Anexo 10). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ L conteniendo: 12,5 μ L del reactivo LongAmp® Hot Start *Taq* 2X Master Mix, 0,5 μ L de $MgSO_4$ (50mM), 1 μ L del *forward primer* (EDH1_short [10 μ M]), 1 μ L del *reverse primer* (DV_consensus [10 μ M]), 5 μ L de agua libre de nucleasas y 5 μ L de ADNc, en la figura 3.1 se observa la disposición de los cebadores utilizados (104). La reacción de amplificación del gen E se realizó bajo las condiciones sugeridas por el fabricante que se mencionan a continuación: 94°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 65°C por 2 minutos y 5 segundos, con una extensión final de 65°C por 10 minutos. La temperatura de fusión fue calculada mediante la herramienta proveída por el fabricante (disponible en: <http://tmcalculator.neb.com/#!/main>).

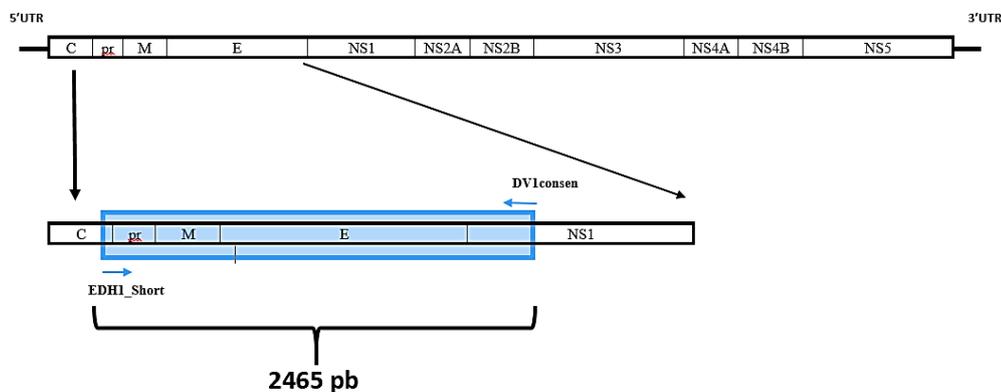


Figura 3.1: Esquema de ubicación de los cebadores empleados para la amplificación del gen que codifica la Proteína E.

Los productos de amplificación generados fueron de 2465pb

Los productos de amplificación 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 (*GE Healthcare, San Francisco, CA, EUA*) con fuente de poder (*Electrophoresis Power Supply EPS 60, GE Healthcare, San Francisco, CA, EUA*) a voltaje constante 60V por 1,5 horas. La tinción se llevó a cabo con Diamond™ Nucleic Acid Dye (*Promega, Madison, WI, EUA*) y la visualización

mediante un trans-iluminador de luz UV. A fin de comparar el tamaño de los productos amplificados se incluyó en cada corrida electroforética un marcador de tamaño molecular de 1 Kb (Plus DNA Lader, *Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*). Los productos de amplificación generados para DENV-1 fueron de 2465pb. Los resultados obtenidos se registraron mediante fotodocumentador Image Quant™ LAS 500 (*GE Healthcare Life Sciences, San Francisco, CA, EUA*).

3.11 Secuenciación

Los productos de amplificación fueron sometidos a secuenciación por el método de Sanger (105) utilizando un conjunto de cinco cebadores para la amplificación de fragmentos solapados para abarcar por completo el gen E (Anexo 11), en la figura 3.2 se observa la ubicación de los cebadores utilizados (104).

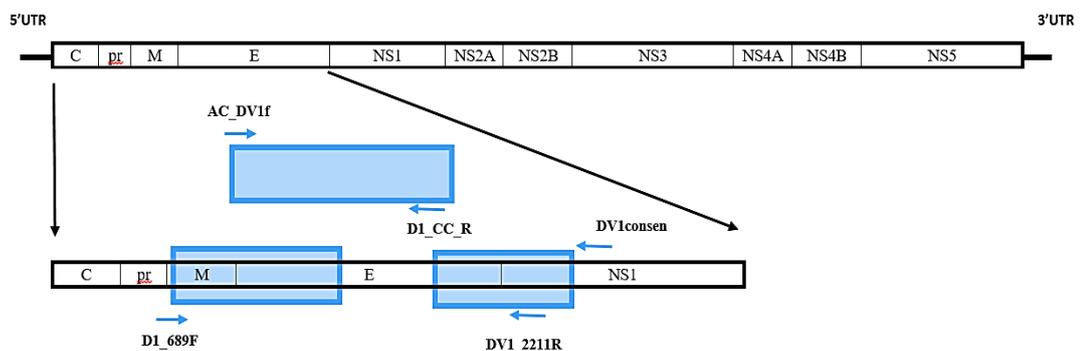


Figura 3.2: Esquema de ubicación de los cebadores empleados para la secuenciación del gen que codifica la Proteína E.

Los fragmentos indicados fueron secuenciados en la Compañía GENEWIZ® (Nueva Jersey, EUA).

3.12 Análisis Filogenético de las secuencias nucleotídicas

3.12.1 Secuencias obtenidas y análisis inicial

Las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína E (1485 pb) obtenidas en este estudio fueron ensambladas a partir de los fragmentos de las secuencias mediante el programa SeqMan NGen® Versión 12.0. DNASTAR (*Madison, Wisconsin, EUA*). Seguidamente los alineamientos de las secuencias se realizaron utilizando el sistema MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) (106).

Mediante la herramienta *Dengue Virus Typing Tool* (Genome Detective) (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/dengue/>) se llevó a cabo el análisis inicial de las secuencias, la identificación de genotipos y la construcción del primer árbol filogenético bajo los parámetros preestablecidos por la herramienta de la siguiente manera: el método de distancias o agrupamiento de vecinos *Neighbor-joining-Tree* (NJ-tree), soportados estadísticamente por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas y un soporte de *bootstrap* >70% (107).

3.12.2 Base de datos de secuencias del GenBank

Con la finalidad de ejecutar el análisis filogenético se construyó una matriz de secuencias del gen que codifica la proteína E correspondientes a aislados de diferentes países por años, haciendo énfasis en las secuencias de genoma viral de aquellas que circularon en la región, las mismas fueron colectadas de la página de internet de la herramienta *Virus variation* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.cgi>). La base de datos incluyó el código de acceso al *GenBank*, país y año de aislamiento. La codificación de las secuencias obtenidas en este estudio fue compuesta por el nombre del país de aislamiento seguido por el código de estudio y el año de aislamiento o colección de la misma. Las secuencias fueron alineadas mediante el sistema MAFFT descrito anteriormente, además las secuencias depositadas como clones, mutantes y recombinantes fueron excluidas. Para el alineamiento final de las secuencias nucleotídicas se utilizaron 331 secuencias del gen de la proteína E de DENV-1 recuperadas del *GenBank*, además fue incluida una cepa de DENV-1 Genotipo I aislada en Myanmar en el 2002 (AY726552) para ser utilizada como grupo externo a fin de enraizar los árboles filogenéticos (Anexo 12).

3.12.3 Análisis filogenético

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó utilizando el programa *IQTree* siguiendo el método de Máxima verosimilitud (*Maximum likelihood, ML*) (108,109). La matriz de secuencias fue analizada mediante el programa *IQTree-Model Finder* (110) para identificar el mejor modelo de sustitución nucleotídica. Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el programa *IQTree* y soportados estadísticamente por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas. Las estimaciones

de la divergencia evolutiva dentro y entre las secuencias fueron calculadas utilizando el modelo de “*p-distance*” con 1000 réplicas mediante el programa MEGA X (111).

3.13 Análisis de la Proteína de la Envoltura:

El grado de conservación de cada residuo en la estructura de la proteína E fue calculado en base al alineamiento de la secuencia de aminoácidos, utilizando el programa ConSurf, además de realizar modelado por homología (112). La estructura de la proteína E se obtuvo en base el servidor I-Tasser (113) a partir de la secuencia codificante de las mismas. Los cálculos fueron visualizados en el modelo atómico mediante el programa UCSF Chimera (RBVI, Universidad de California, San Francisco. NIGMS) (114).

3.14 Asuntos éticos:

Las muestras de pacientes que se emplearon en el presente estudio corresponden a muestras almacenadas en la seroteca del IICS, dentro del proyecto marco en la línea de investigación “*Caracterización y epidemiología molecular del virus del dengue y otros arbovirus en infecciones humanas*”. Las muestras fueron colectadas en distintos proyectos anteriores del 2011 al 2018, contando todos ellos con la debida aprobación de los Comités de Ética y Científicos según los siguientes códigos (P15/2011; P34/2012; P06/2017; P28/2017). El presente trabajo cuenta con la Aprobación de los Comités Científico y Ético del IICS-UNA (P13-2019).

Las mismas fueron colectadas de forma que no representaron riesgo para la salud de los pacientes. No se requirieron muestras biológicas adicionales. Fueron debidamente codificadas y anonimizadas de tal modo a preservar la identidad de los pacientes, lo cual aseguró la confidencialidad de los datos obtenidos dentro del estudio. Los códigos son de manejo único y exclusivo de los investigadores, en ningún caso serán publicados los nombres de los participantes. Se cuenta con el consentimiento informado firmado por los pacientes que participan de los distintos estudios.

El presente estudio no genera un beneficio directo para el paciente, el mismo fue llevado a cabo con fines de investigación. Los principales resultados de interés para la salud del paciente y para el diagnóstico de dengue (Test rápido de detección del antígeno NS1), fueron entregados de inmediato al momento de la consulta, considerando la necesidad del diagnóstico inmediato.

Los resultados obtenidos en este estudio no afectan la calidad de vida o salud actual del paciente, debido a que la enfermedad causada por este virus es eliminada en la mayoría de los casos, es decir, en un individuo inmunocompetente el virus es eliminado en su totalidad por el sistema inmune sin generar periodos de latencia o la capacidad de reactivación o la posibilidad de recaídas como ocurren en otras patologías. Los resultados publicados tendrán beneficios para estudios posteriores y aportarán datos relevantes para mayor conocimiento de este virus que circula a nivel local.

El estudio realizado forma parte del Proyecto Marco “*Detección y caracterización de infecciones causadas por arbovirus en pacientes con enfermedad aguda del Departamento Central*” (que cuentan con la aprobación del CC y CE IICS-UNA P39/2018; Universidad de Emory IRB00097089).

4 RESULTADOS

4.1 Detección, tipificación y cuantificación de DENV-1

Fueron incluidas al estudio 1120 muestras de la seroteca del Departamento de Producción del IICS colectadas entre los años 2011 al 2019 consistentes en sueros o aislados de cultivo celular, en las mismas fueron analizadas la presencia del genoma de DENV (Anexo 13).

Las muestras con resultados positivos para DENV fueron tipificadas. En cada corrida fueron incluidos oligonucleótidos sintéticos de los cuatro tipos de DENV (DENV-1-2-3-4) como controles positivos y agua libre de nucleasas como control negativo (Figura 4.1).

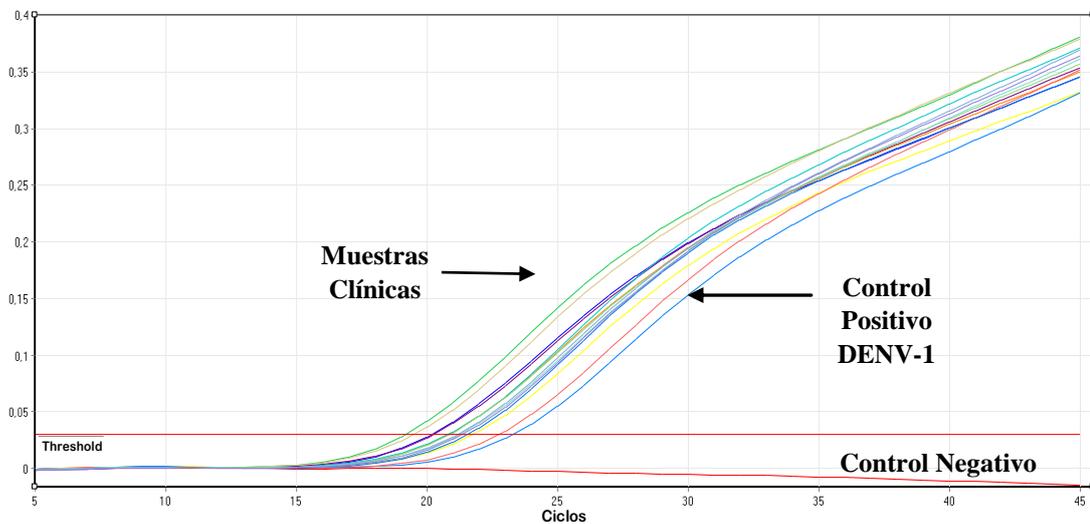


Figura 4.1: Curvas de amplificación de muestras en las cuales se detectó la presencia del genoma de DENV-1 por rRT-PCR.

Control positivo de DENV-1: oligonucleótido sintético de concentración $6.0 \log_{10}$ copias/ μ L (color celeste), Control Negativo (agua libre de ARNasas/ADNasas) (color rojo).

Los resultados de los tipos de DENV obtenidos en las muestras incluidas por años, se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Resultados de tipos de dengue por año

Año	Casos				Total por año
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
2011	31	18	-	-	78
2012	-	15	-	2	26
2013	-	17	-	-	46
2016	40		-	7	120
2018	109	3	-	3	231
2019	-	15	-	67	619
	180	68		79	1120

De acuerdo a lo señalado anteriormente, en los años 2011, 2016 y 2018 se obtuvieron resultados positivos para la presencia del genoma de DENV-1 en 180 de las muestras analizadas. A partir de estos resultados, fue realizada cuantificación viral mediante PCR en tiempo real.

Fueron seleccionadas grupos de muestras correspondientes a cada año siguiendo los siguientes criterios:

- que cuenten con suficiente volumen de muestra para realizar las pruebas del estudio,
- con carga viral relativa (descartando aquellas muestras en las cuales el ARN viral no pudo ser amplificado satisfactoriamente a través de las técnicas empleadas),
- procedencia, de modo a incluir muestras provenientes de diferentes ciudades del Departamento Central

Conforme a los criterios anteriores, fueron seleccionadas un total de 55 muestras: 16/31 correspondientes al año 2011, 20/40 del 2016 y 19/109 del 2018, las cargas virales se detallan en el Anexo 14.

4.2 Amplificación del gen que codifica para la proteína de la Envoltura

Fue amplificada la región del gen que codifica la proteína E en las muestras positivas para DENV-1 seleccionadas, utilizando una técnica de amplificación desde la región del gen que codifica para la membrana (PrM) hasta una pequeña porción del gen de proteína NS1 (2465pb), aquellas que presentaban señales de amplificación fueron sometidas a secuenciación (Figura 4.2). De las 55 muestras amplificadas, en todas ellas se pudo visualizar el fragmento con banda única.

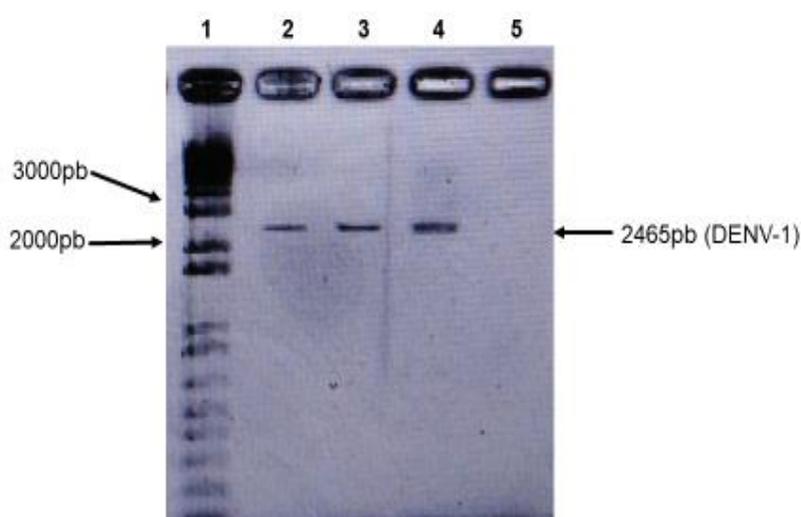


Figura 4.2: Resultados de la amplificación del gen de la Proteína E

Electroforesis en gel de agarosa al 1,8% de los productos obtenidos por amplificación del gen de la proteína E para secuenciación. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb (Invitogen, Thermofisher Scientific); Carril 2: Control positivo de DENV-1 aislado en Paraguay 2011 (2465pb); Carriles 3-4: muestras correspondientes a DENV-1 (2465pb); Carril 5: Control Negativo (agua libre de ARNasas/ADNasas).

4.3 Secuenciación

Los productos de amplificación que abarcaban el gen de la proteína E fueron sometidos a secuenciación nucleotídica por el método de Sanger. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron posteriormente ensambladas a fin de obtener la secuencia consenso del gen que codifica para la proteína E para cada muestra.

4.4 Análisis filogenético basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína E de DENV-1

Fueron obtenidas secuencias completas del gen que codifica para la proteína E en 44/55 muestras de DENV-1 (1485 pb) que presentaron banda única en la amplificación previa a la secuenciación, distribuidas en los años de colecta de la siguiente manera: 12/16 para muestras del 2011, 13/20 para muestras del 2016, 19/19 para muestras del 2018.

Las secuencias obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante la herramienta *Dengue Virus Typing Tool*. El análisis inicial basado en la secuencia del gen que codifica para la proteína E expuso las distintas agrupaciones conforme a los cinco genotipos descritos para DENV-1. Todas las secuencias de Paraguay obtenidas en este estudio se agruparon dentro del genotipo V, junto con las demás cepas de circulación predominante en América (Figura 4.3).

- DENV-1 Genotype I █
- DENV-1 Genotype II █
- DENV-1 Genotype III █
- DENV-1 Genotype IV █
- DENV-1 Genotype V █

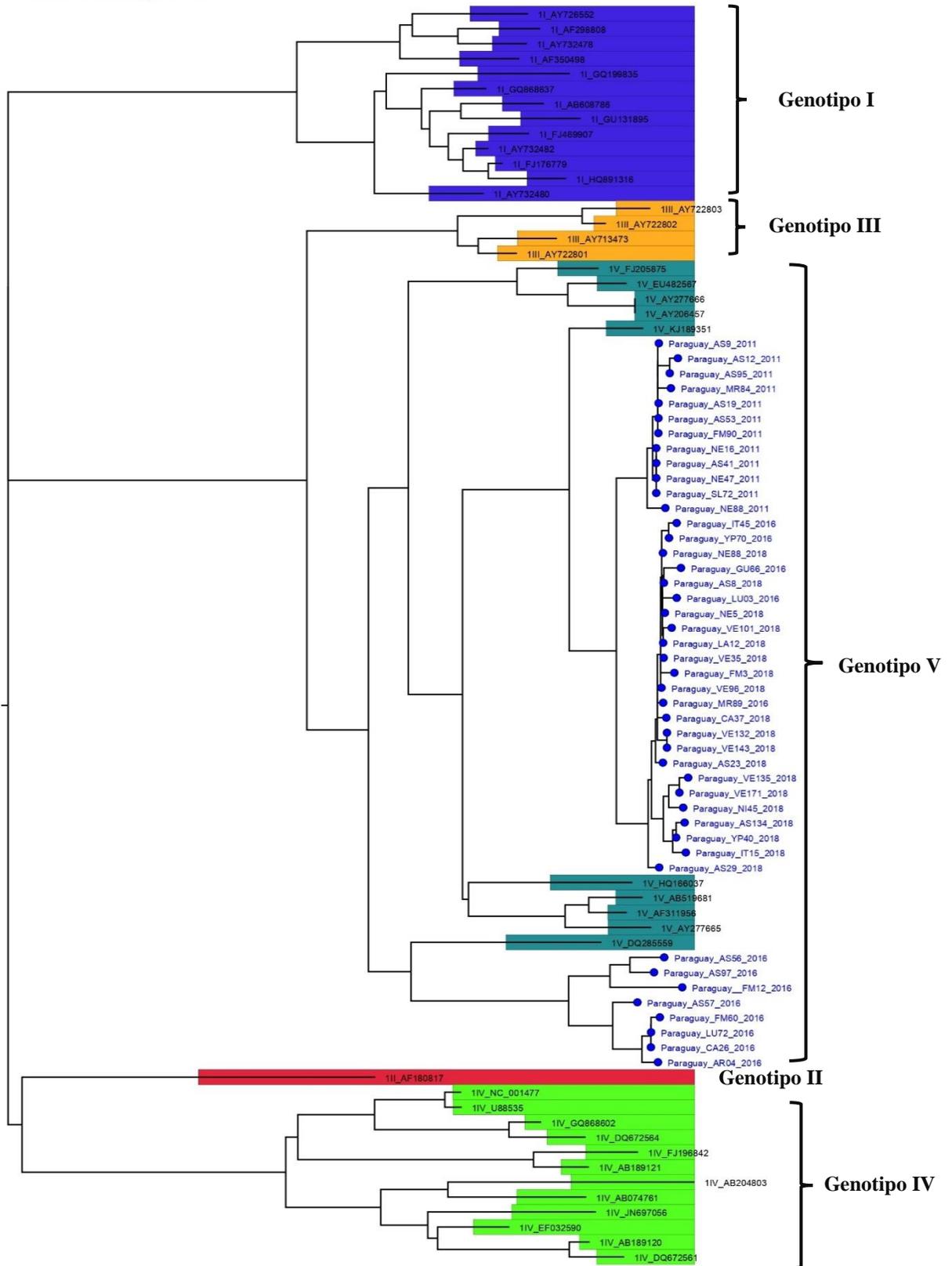


Figura 4.3: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 obtenido mediante la herramienta *Dengue Virus Typing Tool*.

Árbol filogenético deducido a partir de las secuencias del gen de la proteína E de DENV-1 obtenidas mediante secuenciación de muestras de Paraguay de los años 2011, 2016 y 2018, utilizando el método de *Neighbor-Joining-Tree*, la fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, *clustering* >70%.

Las 44 secuencias obtenidas en este estudio se encuentran marcadas con ●, las mismas llevan como codificación el nombre del país, el código de estudio y el año de colecta. Las demás secuencias utilizadas por el programa de manera predeterminada son representativas de los cinco genotipos para DENV-1, los mismos se encuentran resaltados en colores distintos cuya referencia acompaña a la imagen. Las codificaciones de las cepas están compuestas de: tipo de DENV, genotipo y código de acceso *GenBank*.

A fin de mejorar la claridad del análisis, se realizó la construcción de árbol filogenético en base a secuencias del gen E de DENV-1 del Genotipo V, en el cual se encontraban agrupadas las secuencias obtenidas en el estudio. Cabe destacar que, dentro de este genotipo se encontraron secuencias de virus aislados de Paraguay en años anteriores formando parte de diferentes grupos (Figura 4.4)

Conforme al conjunto de datos analizados, teniendo en cuenta que fueron incluidas secuencias de Paraguay correspondientes a estudios anteriores (1999 y 2000), la topología del árbol filogenético demostró que las secuencias de DENV-1 obtenidas en Paraguay se distribuyeron en cinco grupos que fueron denominados I, II y III, IV y V los cuales fueron soportados con altos valores de *bootstrap* ($\geq 86\%$).

El grupo I comprendió a los virus aislados en 2011, relacionados filogenéticamente a virus que circularon en Argentina en el 2010 (KC692514), así también con DENV-1 detectados en Brasil en el 2010 (KF672768) y Bolivia en el 2009 (KC692495). El grupo II incluyó a dos secuencias de DENV-1 de Paraguay del 2000 agrupadas con virus aislados en Argentina en el mismo año (AF514876 y AY277665). En el grupo III se agruparon secuencias de DENV-1 paraguayas entre 1999 y 2000 relacionadas filogenéticamente con secuencias de virus aislados en Argentina en el año 2000, estas secuencias derivan de secuencias correspondientes a cepas de Puerto Rico de 1988. El grupo IV comprendió ocho secuencias de DENV-1 paraguayas que se encontraban divididas en dos subgrupos: el subgrupo IV-a en el que se encontraban agrupadas tres secuencias del año 2016 relacionadas filogenéticamente con DENV-1 descritos en Brasil en 2012 (KT438582) y 2013 (KP858114), el subgrupo IV-b en el que se agruparon cinco secuencias del año 2016 que se encontraban relacionados filogenéticamente a secuencias de DENV-1 aislados en Argentina en 2016 (KY283851 y KY283852), así como a otras identificadas en Rio de Janeiro Brasil entre 2015 (MH401985) y 2016 (MH401996). En el grupo V se encontraban agrupadas las secuencias de DENV-1 que circularon en el 2016 y 2018 relacionadas filogenéticamente a un grupo de varias secuencias de DENV-1 provenientes de Uruguay y Argentina de 2016 así a un grupo de aislados de Brasil 2011.

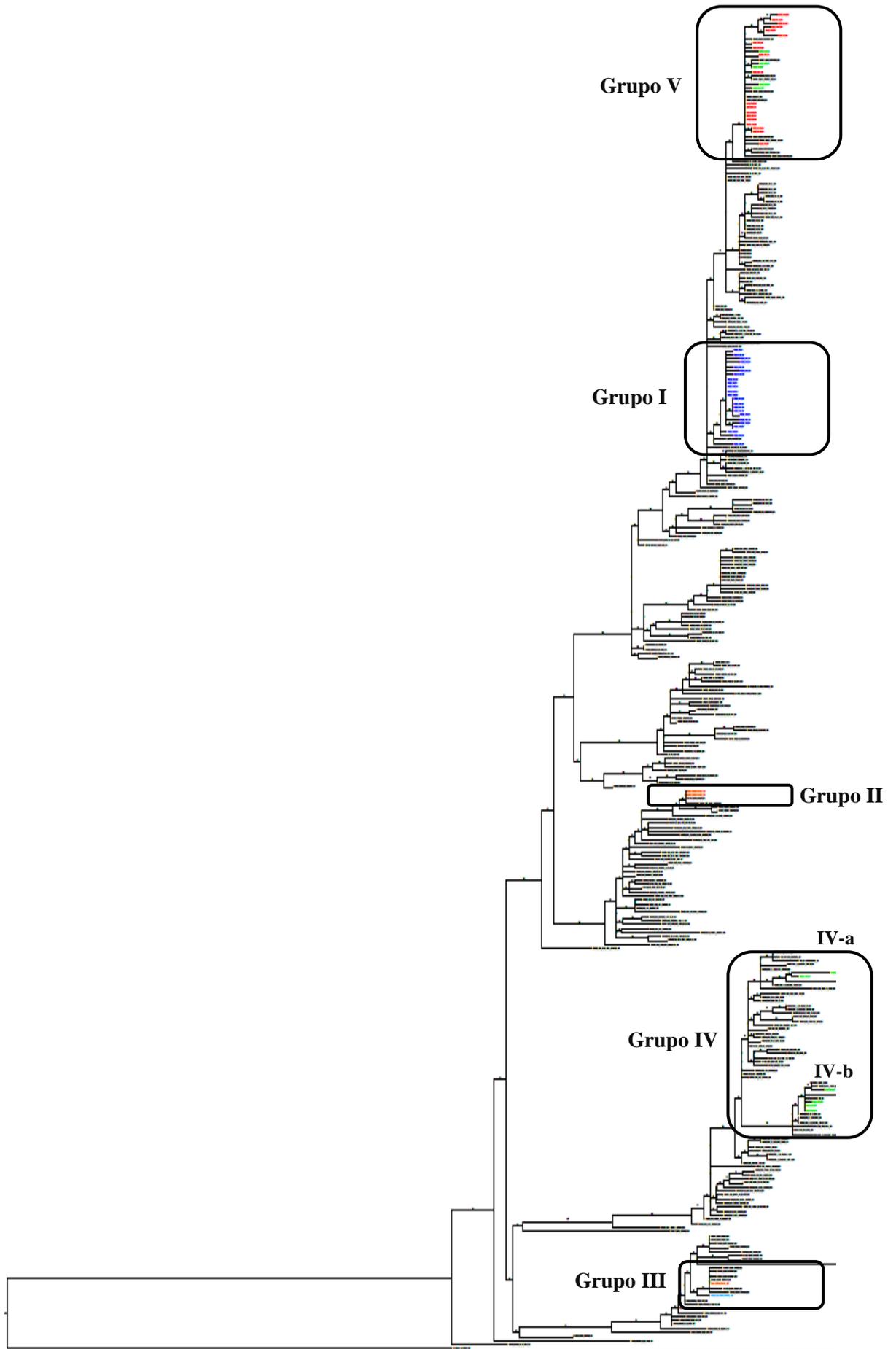


Figura 4.4: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) mediante el método de Máxima verosimilitud (*Maximun likelihood*).

Árbol filogenético deducido a partir de las secuencias del gen de la proteína E de DENV-1 obtenidas mediante secuenciación de muestras de Paraguay de los años 2011, 2016 y 2018, además se incluyeron secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a Paraguay de los años 1999, 2000 y 2011. Se puede observar que las secuencias de DENV-1 de Paraguay se distribuyen en 5 grupos. Las secuencias del 2011 están representadas en color azul, las de 2016 (verde), las del 2018 (rojo). Para la construcción del árbol se utilizó el método de máxima verosimilitud. El mejor modelo de sustitución nucleotídica fue el de GTR (*General Time Reversible*), considerando una frecuencia de base F, heterogenicidad entre sitios I, y una tasa de variación con distribución gamma ($G=4$) **GTR+F+I+Γ4**. La fiabilidad del árbol filogenético inferido fue estimada por el método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas, se muestran los valores de *bootstrap* superiores a 75% 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-1 del genotipo I aislada en Myanmar (Código de acceso: AY726552). Las codificaciones de las cepas están compuestas de: Código de acceso al GenBank_País_año.

Disponible en:

<https://drive.google.com/drive/folders/1F9b698WXinR7mQYI8uBHGkTg2NAEmuHE?usp=sharing>

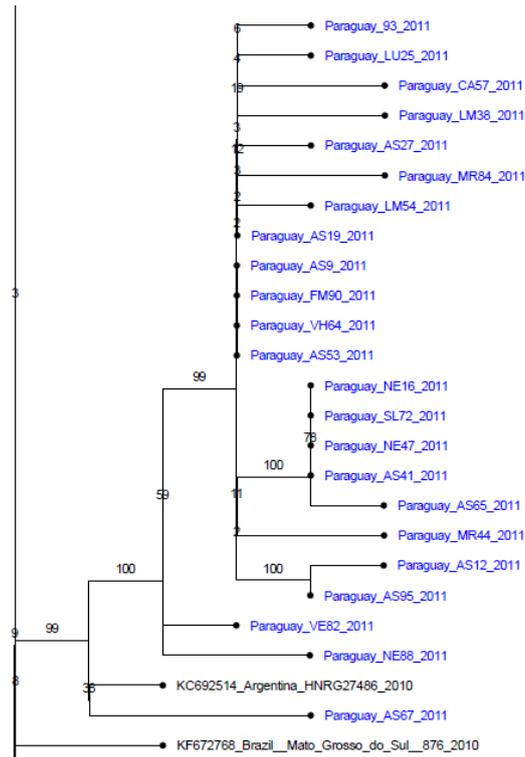
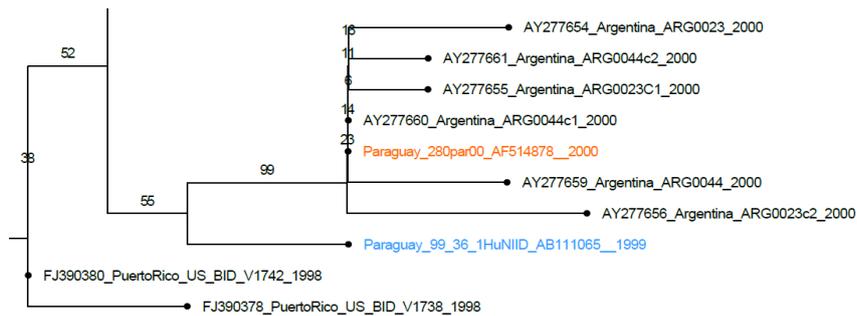
A**B****C**

Figura 4.5: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para los grupos I, II y III

Se observa la distribución de las distintas secuencias correspondiente a los grupos presentados A) Grupo I B) Grupo II C) Grupo III. Las secuencias del 2011 están representadas en color azul, las de 1999 en celeste y las de 2000 en naranja.

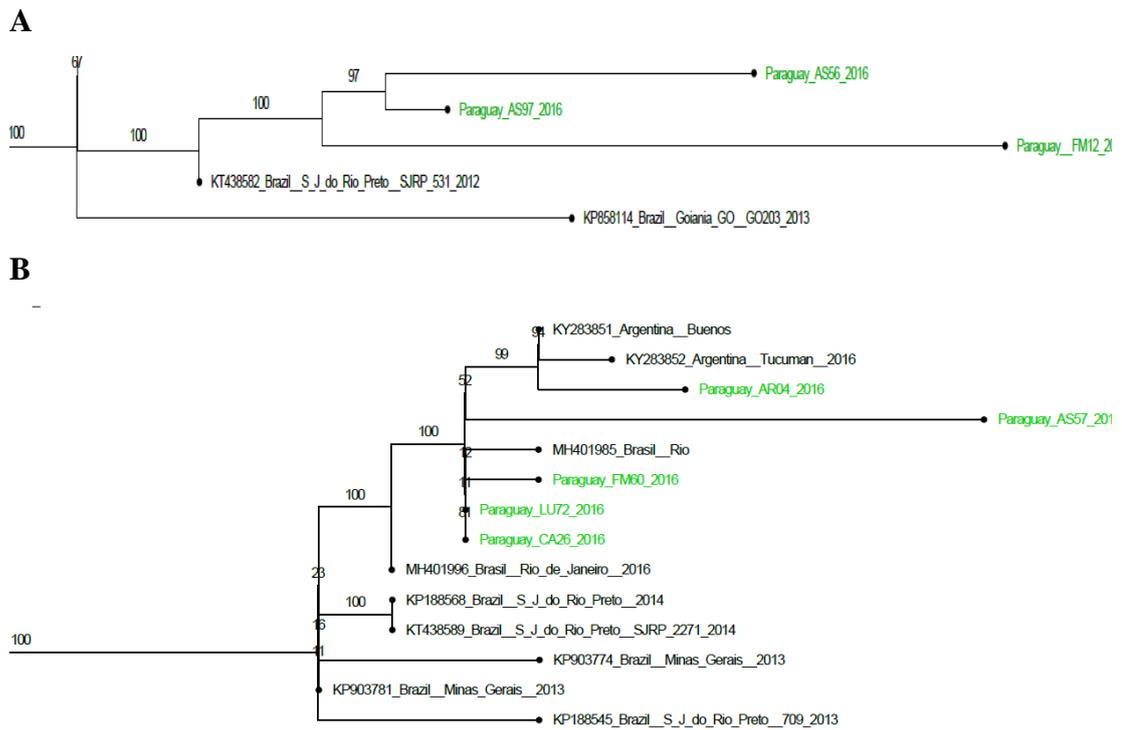


Figura 4.6: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para el grupo IV

Se observa la distribución de las distintas secuencias correspondiente a los grupos presentados **A)** Grupo IV-a **B)** Grupo IV-b. Las secuencias del 2016 están representadas en color verde.

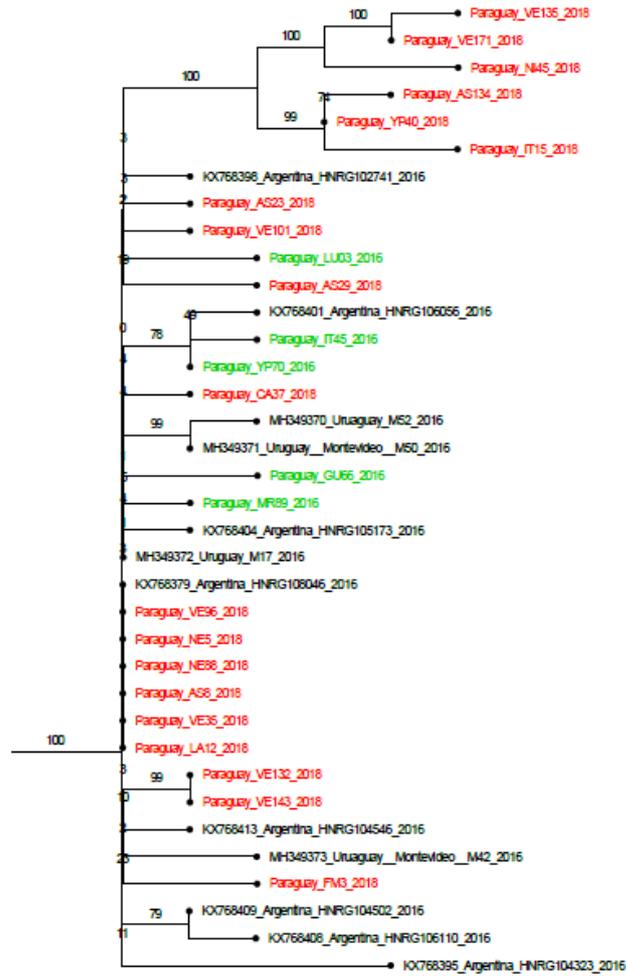


Figura 4.7: Ampliación del árbol filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E de DENV-1 (Genotipo V) para el grupo V

Las secuencias del 2016 están representadas en color verde, las del 2018 en color rojo.

4.5 Análisis de la divergencia nucleotídica

Se realizaron estimaciones de la divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias entre los grupos de secuencias correspondientes a DENV-1 detectado en Paraguay en los diferentes años, las mismas se encuentran en valores de porcentajes (Tabla 4.2).

Se observó una divergencia nucleotídica de 0,78 a 3,99% entre los grupos comparados, mostrando una tendencia de mayor divergencia conforme los grupos se encontraban separadas en el tiempo. El mayor porcentaje de divergencia nucleotídica se observó entre los virus detectados en los años 2000 y 2016 (3,99%).

Tabla 4.2: Estimaciones de divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias de DENV-1 detectado en Paraguay en diferentes años

Grupo 1	Grupo 2	Divergencia nucleotídica (%)	Desvío estándar
2011	2018	0,78	0,20
1999	2000	2,29	0,30
2016	2018	2,89	0,32
2011	2016	3,09	0,35
2000	2011	3,31	0,39
2000	2018	3,41	0,40
1999	2011	3,58	0,46
1999	2018	3,58	0,47
1999	2016	3,94	0,41
2000	2016	3,99	0,35

Se muestra el número de diferencias de bases por sitio de promediar todos los pares de secuencias entre grupos. El desvío estándar se muestra en la última columna. La variación de la tasa entre los sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 4). Este análisis involucró 48 secuencias de nucleótidos: 44 secuencias descriptas en este estudio y 4 secuencias ya depositadas en el *GenBank* anteriormente (1999 y 2000). Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1485 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (111).

Además fue estimada la divergencia nucleotídica promedio sobre pares de secuencias dentro de los grupos de secuencias conformados por cada año, las mismas se encuentran en porcentajes (Tabla 4.3). Se observó una divergencia de 0,12 a 2,71%. La mayor divergencia fue observada dentro del grupo conformado por secuencias del año 2016 en el que se observa una divergencia de $2,71\% \pm 0,28$. Estas secuencias se encontraban en dos grupos distintos como fue señalado anteriormente (Figura 4.4).

Tabla 4.3: Estimaciones de divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias dentro de grupos de DENV-1 detectado en Paraguay en diferentes años.

Año	Divergencia nucleotídica (%)	Desvío estándar
1999	n/c	n/c
2000	2,38	0,34
2011	0,12	0,04
2016	2,71	0,28
2018	0,22	0,06

Se muestra el número de diferencias de bases por sitio a partir del promedio de todos los pares de secuencias dentro de cada grupo. El desvío estándar se muestra en la última columna. La variación de la tasa entre los sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 4). Este análisis involucró 48 secuencias de nucleótidos que corresponden a secuencias Paraguayas de 1999, 2000, 2011, 2016 y 2018 (ver figura 4.4). Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 1485 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (111). La presencia de n/c en los resultados denota casos en los que no fue posible estimar distancias evolutivas.

4.6 Distribución geográfica por año de las muestras secuenciadas

Los datos de las procedencias y distribuciones geográficas de las muestras secuenciadas de acuerdo a los años de circulación se pueden observar en la Tabla 4.4. Así para el año 2011 y 2016 la mayoría provino de la ciudad de Asunción, en tanto que en año 2018 la mayoría de las muestras era provenientes de Villa Elisa.

Tabla 4.4: Distribución geográfica de las muestras secuenciadas por año

Ciudad	2011	2016	2018
	Frecuencia (%) n=12	Frecuencia (%) n=13	Frecuencia (%) n=19
Asunción	6 (50)	3 (23)	4 (21)
Areguá	-	1 (7,7)	-
Capiatá	-	1 (7,7)	1 (5,3)
Fernando de la Mora	1 (8,3)	2 (15,4)	1 (5,3)
Guarambaré	-	1 (7,7)	-
Itauguá	-	1 (7,7)	1 (5,3)
Lambaré	-	-	1 (5,3)
Luque	-	2 (15,7)	-
MRA	1 (8,3)	1 (7,7)	-
Nueva Italia	-	-	1 (5,3)
Ñemby	3 (25)	-	1(5,3)
San Lorenzo	1 (8,3)	-	-
Villa Elisa	-	-	7 (36,8)
Ypacaraí	-	1 (7,69)	1 (5,3)
Total	12	13	19

4.7 Análisis de temporalidad y distribución geográfica del DENV-1 detectado en 2016

Con la finalidad de buscar posibles explicaciones de la circulación de dos grupos distintos de DENV-1 en el 2016 fueron analizadas la fecha en la que fueron tomadas las muestras y la procedencia de los pacientes. En la siguiente tabla se puede observar con detalle que las muestras fueron colectadas en fechas muy próximas. Así también se puede destacar que los grupos no se encontraban circunscriptos a una ciudad en particular.

Tabla 4.5: Fecha de toma de muestra de las muestras positivas para DENV-1 en las que se obtuvieron secuencias del gen de la proteína E.

Grupo	Código	Fecha de toma de muestra	Procedencia
V	Paraguay_LU03_2016	21/3/2016	Luque
IV-a	Paraguay_FM12_2016	22/3/2016	Fernando de la Mora
IV-b	Paraguay_AR04_2016	22/3/2016	Areguá
IV-b	Paraguay_CA26_2016	22/3/2016	Capiatá
V	Paraguay_GU66_2016	23/3/2016	Guarambaré
IV-b	Paraguay_FM60_2016	25/3/2016	Fernando de la Mora
V	Paraguay_MR89_2016	25/3/2016	Mariano Roque Alonso
IV-a	Paraguay_AS56_2016	26/3/2016	Asunción
IV-b	Paraguay_AS57_2016	26/3/2016	Asunción
V	Paraguay_IT45_2016	27/3/2016	Itaiguá
IV-a	Paraguay_AS97_2016	28/3/2016	Asunción
V	Paraguay_YP70_2016	28/3/2016	Ypakarai
IV-b	Paraguay_LU72_2016	29/3/2016	Luque

4.8 Análisis de la Proteína E

Las secuencias nucleotídicas codificantes del gen de la proteína E fueron posteriormente traducidas a secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína de la Envoltura de DENV-1. La misma consta de 495 aminoácidos, y se pliega en tres dominios: dominio I (localización central entre los otros dominios), dominio II (regiones de dimerización y péptido de fusión), dominio III (unión a receptor de superficie celular), además consta de un tallo proximal a la membrana (*membrane-proximal stem*) y un ancla a transmembrana (*transmembrane anchor*) (18,115).

La caracterización molecular realizada a partir de las 44 secuencias permitió la identificación de distintos patrones de nucleótidos responsables de la conservación de algunos aminoácidos en los dominios I, II, III así como y región *Stem* del gen de la proteína E entre las diferentes secuencias y los cambios en los diferentes dominios (Tabla 4.6).

Se observaron ciertas variaciones en cuanto a la presencia de aminoácidos, como E₃₃₈ cuyo cambio de serina a leucina implica diferencia en las propiedades bioquímicas de estos aminoácidos. Por otro lado también se distinguieron cambios en la posición E₃₃₉, en la que se diferenciaron dos grupos conformados por aminoácidos treonina e isoleucina. Para las secuencias del año 2016 se observaron dos grupos diferenciados en cuanto a la presencia de algunos aminoácidos en determinadas posiciones como E₃₃₈ (serina y leucina), E₃₉₄ (arginina y lisina), E₄₂₈ (valina y leucina), E₄₃₆ (valina e isoleucina). Las sustituciones presentadas en la región *Stem* E₄₂₈ y E₄₃₆ consistieron en sustituciones con aminoácidos de propiedades similares.

La proteína de la envoltura es un homodímero que se ensambla y sufre ciertas variaciones en la estructura del virión maduro en el proceso de fusión con la membrana celular para salida del virus, además es la proteína relacionada a la entrada del virus a la célula como mecanismo de infección, fue descrita como una de las proteínas de este virus capaz de desencadenar respuesta inmune, es por ello que determinada variaciones, podrían estar relacionadas a cambios en estas propiedades (21,22).

Mediante el modelado por homología se observó la posición de las sustituciones descritas en la Tabla 4.6 de modo a visualizar si las sustituciones se encontraban expuestas y si podrían estar implicados con los mecanismos de evasión del sistema inmune o mejoramiento del proceso de entrada a la célula a través de receptores.

Así como se puede observar en la Figura 4.8 las variaciones observadas en la estructura obtenida que se presentan en el dominio III en su mayor parte se encuentran expuestas en la superficie de la proteína.

Las sustituciones presentadas en la región *Stem* E₄₂₈ y E₄₃₆ consistieron en sustituciones con aminoácidos de propiedades similares, estas regiones se encuentran relacionadas a la fusión del virión con la membrana celular para su salida (18).

Tabla 4.6: Sustitución y conservación de aminoácidos observadas en la proteína de la Envoltura del DENV1 detectado en Paraguay

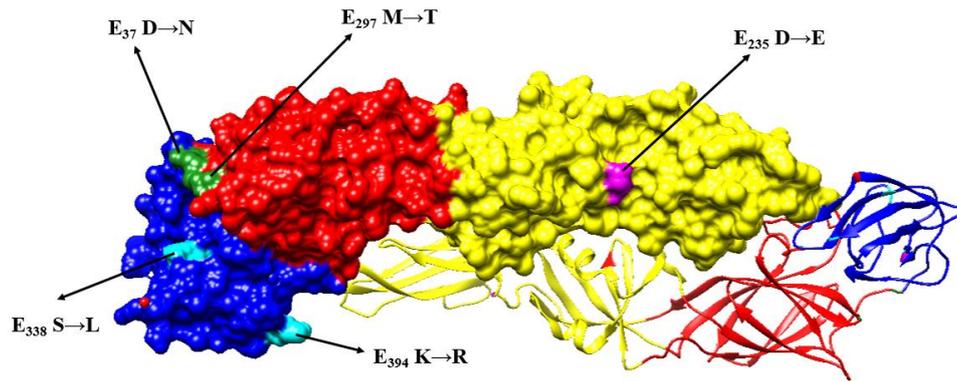
Proteína E/Sustitución de aminoácidos											
ID/Código	Grupo	Dominio I	Dominio II	Dominio I	Dominio III					Stem	
		E ₃₇	E ₂₃₅	E ₂₉₇	E ₃₂₅	E ₃₃₈	E ₃₃₉	E ₃₆₁	E ₃₉₄	E ₄₂₈	E ₄₃₆
AB111065 1999	III	D	D	M	K	S	A	K	K	V	V
AF514883 2000	II	N	.	T	.	<u>L</u>	T
AF514878 2000	III
AF514886 2000	II	N	.	T	.	<u>L</u>	T
AS9 2011	I	N	I	.	R	.	.
AS12 2011	I	N	I	.	R	.	.
NE16 2011	I	N	I	.	R	.	.
AS19 2011	I	N	I	.	R	.	.
AS41 2011	I	N	I	.	R	.	.
NE47 2011	I	N	I	.	R	.	.
AS53 2011	I	N	I	.	R	.	.
SL72 2011	I	N	I	.	R	.	.
MR84 2011	I	N	I	.	R	.	.
NE88 2011	I	N	T	.	R	.	.
FM90 2011	I	N	I	.	R	.	.
AS95 2011	I	N	I	.	R	.	.
IT45 2016	V	N	T	.	R	.	.
AS56 2016	IV-a	N	E	.	R	<u>L</u>	T	.	.	L	I
AS57 2016	IV-b	N	.	.	.	<u>L</u>	T	.	.	L	.
FM60 2016	IV-b	N	.	.	.	<u>L</u>	T	.	.	L	I
GU66 2016	V	N	T	.	R	.	.
YP70 2016	V	N	T	.	R	.	.
LU72 2016	IV-b	N	.	.	.	<u>L</u>	T	.	.	L	I
MR89 2016	V	N	T	.	R	.	.
LU03 2016	V	N	T	.	R	.	.
AS97 2016	IV-a	N	E	.	R	<u>L</u>	T	R	.	L	I

Proteína E/Sustitución de aminoácidos

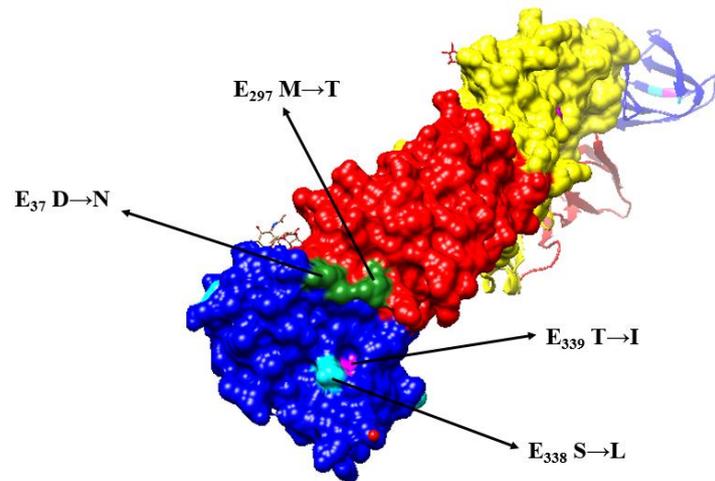
ID/Código	Grupo	Dominio I	Dominio II	Dominio I	Dominio III					Stem	
		E ₃₇	E ₂₃₅	E ₂₉₇	E ₃₂₅	E ₃₃₈	E ₃₃₉	E ₃₆₁	E ₃₉₄	E ₄₂₈	E ₄₃₆
AB111065 1999	III	D	D	M	K	S	A	K	K	V	V
AR04 2016	IV-b	N	.	.	.	<u>L</u>	T	.	.	L	I
FM12 2016	IV-a	N	.	.	R	<u>L</u>	T	R	.	L	I
CA26 2016	IV-b	N	.	.	.	<u>L</u>	T	.	.	L	I
NE5 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE35 2018	V	N	T	.	R	.	.
NE88 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE96 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE101 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE132 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE143 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE135 2018	V	N	T	.	R	.	.
VE171 2018	V	N	T	.	R	.	.
AS134 2018	V	N	T	.	R	.	.
FM3 2018	V	N	T	.	R	.	.
AS8 2018	V	N	T	.	R	.	.
LA12 2018	V	N	T	.	R	.	.
IT15 2018	V	N	T	.	R	.	.
AS23 2018	V	N	T	.	R	.	.
AS29 2018	V	N	T	.	R	.	.
CA37 2018	V	N	T	.	R	.	.
YP40 2018	V	N	T	.	R	.	.
NI45 2018	V	N	T	.	R	.	.

Obs.: Los números en los encabezados indican la posición en la proteína E. Los puntos indican concordancia en los aminoácidos con respecto a la secuencia de referencia. Las sustituciones que cambian las propiedades bioquímicas del aminoácido se muestran subrayadas. AB111065: secuencia del gen de la proteína E de Paraguay del año 1999 que se utilizó como referencia. A: alanina; D: ácido aspártico; E: ácido glutámico; I: isoleucina; K: lisina; L: leucina; M: metionina; N: asparagina; R: arginina; S: serina; T: treonina; V: Valina. Los grupos indicados en la segunda columna corresponden a los descriptos en los árboles filogenéticos obtenidos en el presente estudio. Todas las secuencias corresponden al genotipo V de DENV-1

A



B



C

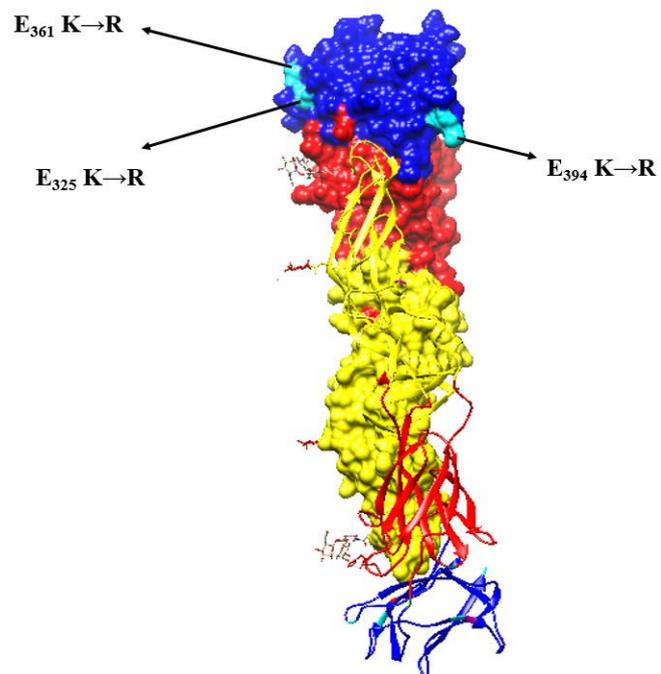


Figura 4.8: Representación de la estructura de la proteína de la Envoltura (Dímero) de DENV-1 obtenida mediante el Programa *Chimera* UCSF.

Se observa la proteína E constituida por tres dominios, Dominio I (Rojo), Dominio II (Amarillo), Dominio III (Azul). Para mejor visualización uno de los monómeros se encuentra en formato *Surface* y el otro en formato *cartoon*.

A) Vista lateral del dímero de la proteína E. **B)** Vista superior de la proteína E. **C)** Vista posterolateral del dímero de proteína E. Las sustituciones que definieron los distintos grupos se encuentran en color *cyan*, las sustituciones en las que se presentan variaciones con otras secuencias están coloreadas en *magenta*, las sustituciones presentadas en el dominio I están coloreadas en *verde*.

5 DISCUSIÓN

Los *arbovirus* o virus transmitidos por artrópodos son considerados importantes agentes causales de enfermedades humanas en todo el mundo, debido a las extensas epidemias ocasionadas principalmente en centros urbanos de países tropicales y subtropicales, entre ellos se puede destacar al DENV (2,3). El aumento del riesgo de emergencia ha sido asociado a la extensa urbanización en regiones tropicales y subtropicales y la expansión del hábitat de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, esto ha ocasionado la aparición de ciclos endémicos permanentes y la transmisión de DENV por temporadas (3,15).

En determinadas áreas geográficas de carácter endémico para el dengue, la aparición de variantes virales individuales a nivel de secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas que circulan por un período de tiempo y luego desaparecen, generalmente pueden ser reemplazadas por otro conjunto de variantes, a este fenómeno se ha denominado "reemplazo de clado", y en ocasiones está relacionado con cambios en la virulencia (45,46,86,87). Es así que se ha demostrada la ocurrencia de reemplazos de los tipos de DENV o genotipos, como reemplazos de grupos o clados dentro de los genotipos (86,94), indicando una asociación entre los mencionados reemplazos y cambios en la incidencia de la enfermedad o persistencia de los mismos (94,95).

Desde el ingreso del DENV en Paraguay, causante de la primera epidemia en el año 1988 y 1989 atribuidas a DENV-1, se han descrito otras numerosas epidemias en el país, tal es así que desde el año 1999 distintos tipos virus de dengue (DENV-1-2-3-4) han circulado en el país de forma continuada a excepción del año 2008 (78–80). Paraguay es un país endémico para la circulación de este virus, según datos de la DGVS se confirmó la circulación del DENV-1 en el país desde el 2009 de forma sostenida hasta el 2019 con excepción del año 2012. El presente estudio fue realizado principalmente con muestras del Departamento Central, el cual cuenta con 2.158.215 habitantes hasta el 2019, y representa el departamento más poblado (35% de la población del país). De acuerdo con los datos reportados por la DGVS, la región de estudio representa el 2/3 de los casos de dengue descriptos en el Paraguay hasta el año 2018 (83–85).

Conforme a lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se ha analizado la variabilidad genética del DENV-1 para dar explicación a la persistencia en la circulación durante los años de estudio.

Como limitación se puede mencionar que este estudio se llevó a cabo con muestras de la seroteca del Departamento de Producción del IICS y probablemente no sean representativas del país, pero los resultados podrían aportar información acerca de la circulación y variabilidad de DENV-1 a nivel de Asunción y el Departamento Central, por otra parte no se pudo establecer una relación con el cuadro clínico ya que no se contaba con la información clínica de todos los pacientes.

En este estudio, se ha identificado la presencia de DENV-1 en las muestras correspondientes a los años 2011, 2016 y 2018, esto se encuentra en coherencia con los reportes oficiales de la DGVS que ha señalado la circulación de este tipo de virus de dengue en el 2011, con predominio de DENV-1 en los años 2016 y 2018 (82,116,117). Por otro lado, en las muestras correspondientes a los años 2012, 2013 y 2019 no fueron detectadas la presencia de DENV-1, estos resultados están relacionados con los datos de DGVS que reportó la ausencia de DENV-1 en el año 2012 (118), y para los años 2013 y 2019 el predominio en la circulación de DENV-2 y DENV-4 respectivamente (81,119).

Para el análisis inicial de las secuencias se utilizó la herramienta *Dengue Virus Typing Tool (Genome Detective)*, en el que se identificó que las 44 secuencias de este estudio se agruparon con el genotipo V de DENV-1, genotipo que incluye cepas y aislados principalmente circulantes en América (Sudamérica, América Central y la región del Caribe) así como los aislados de África, India, y del Sudeste asiático (47,48). Estos hallazgos concuerdan con estudios anteriores de muestras de Paraguay de 1999 y 2000 como los de *Ito et. al.* y *Diaz Aquino et. al.* En los que han descrito que las secuencias analizadas correspondían al genotipo V de DENV-1 (120,121).

Mediante los análisis filogenéticos basados en el gen de la proteína E de las secuencias obtenidas en este estudio así como secuencias de Paraguay identificadas anteriormente, se distribuyeron en cinco grupos, denominados grupo: I, II, III, IV, V. De los grupos citados anteriormente los grupos IV y V fueron grupos nuevos no descritos en estudios anteriores. La presencia de distintos grupos podría deberse a la introducción de nuevos linajes en los años abarcados.

Se observó que los DENV-1 detectados en el año 2011, fueron agrupados junto a las secuencias del mismo año que ya se encontraban depositadas en el *GenBank* correspondientes a estudios anteriores. El análisis filogenético expuso una relación cercana del DENV-1 aislado en Paraguay en 2011 con una secuencia correspondiente a DENV-1 aislado en Argentina en 2010, lo que sugiere que posiblemente este linaje se dispersó desde Argentina a Paraguay. Una posible hipótesis sobre la introducción de DENV-1 desde Argentina podría deberse a la dinámica poblacional y las migraciones de paraguayos a dicho país por motivos diversos (laborales, comercio, viajes, turismo, etc.).

Los grupos descritos en estudios previos, como el grupo II y III correspondientes a virus circulantes en Paraguay en 1999 y 2000, se encontraban relacionados estrechamente con secuencias de cepas argentinas de DENV-1. Esta relación podría dar una explicación a la diseminación desde Paraguay a Argentina como fue descrita anteriormente. Así, un estudio de dinámica espacio-temporal de diseminación de DENV-1 en las Américas propuso la difusión de este virus desde Paraguay a Argentina en 2000 (122–124). La observación de dos linajes distintos y separados entre 1999 y 2000 se fundamenta en el reemplazo de clados y la circulación de un clado distinto al año siguiente.

En relación al grupo IV se pudo evidenciar la presencia de dos sub-grupos. El sub-grupo IV-a se encontraba relacionado al DENV-1 circulante en Brasil en 2012 y 2013. Una posible explicación podría ser la introducción de este linaje en el 2013 y su circulación sostenida hasta el 2016 en el Paraguay, aunque no se cuentan con suficientes datos para establecer esta relación. Por otro lado el sub-grupo IV-b se encontraba muy estrechamente relacionado al DENV-1 detectado en Argentina en 2016 y con virus de Rio de Janeiro, Brasil en 2015 y 2016. Como posible explicación se puede plantear que el linaje circulante en Brasil en el 2015 continuó circulando en el 2016 y las mismas fueron importadas a Paraguay desde Brasil a finales de 2015 o inicios de 2016. Esto puede estar relacionado con el intenso tráfico entre ambos países y el movimiento de paraguayos a dicho país por actividades relacionadas al turismo. El virus introducido desde Brasil y circulante en Paraguay en 2016, pudo seguir una ruta desde Paraguay a Argentina debido al relacionamiento de estas secuencias con las secuencias paraguayas. Otra posible explicación sobre esto podría ser que el virus fue

introducido al Paraguay desde Brasil en el 2015 y continuó circulando en el país hasta el 2016, sin embargo esto no cuenta con sustento ya que a la fecha no se encuentran datos de secuencias de DENV-1 circulante en el país del 2015. También existe la posibilidad de que los casos hayan sido importados desde Argentina como en ocasiones anteriores.

El grupo V estaba conformado por secuencias de DENV-1 detectado en 2016 y 2018, las mismas se encontraron estrechamente relacionadas a DENV-1 circulante en Argentina y Uruguay en el año 2016. Como dato relevante se puede mencionar que Uruguay no había registrado la circulación de DENV, desde la introducción del mismo en el continente americano, hasta el 2016. En esta ocasión, la circulación del virus estuvo relacionada principalmente con el DENV-1 y algunos de los casos fueron atribuidos a casos importados desde Paraguay. El árbol filogenético de nuestro estudio está en concordancia con lo mencionado anteriormente, mostrando fuerte relacionamiento entre las secuencias de DENV-1 de Paraguay con las secuencias depositadas correspondientes a DENV-1 de Uruguay de 2016. Esto sugiere que uno de los linajes circulantes en Paraguay en 2016 haya migrado al Uruguay. Se puede además mencionar que los estudios de DENV-1 de Uruguay del 2016 habían identificado la circulación de cuatro variantes para el Linaje 1-Sudamericano y tres variantes para el Linaje 2-Sudamericano, en total fueron descritas siete variantes.

Muchas de las explicaciones mencionadas hasta ahora están relacionadas a fenómenos de migración, lo cual podría estar reforzado teniendo en cuenta la dinámica de movilización en la triple frontera. Así, es muy probable que los casos o la circulación viral en los tres países se encuentren relacionados al movimiento masivo de la población.

Las secuencias que se encontraban dentro del grupo V estaban relacionadas al DENV-1 circulante en Brasil en el 2011. En base a las secuencias depositadas hasta la fecha se podría establecer una vía de ingreso a Paraguay de las mismas, relacionadas a las cepas circulantes en Argentina en el 2016 considerando la dinámica poblacional, así como los fenómenos de migraciones como se mencionó previamente.

En cuanto al DENV-1 circulante en el 2016 se pudieron diferenciar dos grupos distintos descritos como IV (sub-grupos IV-a y IV-b) y V, cabe resaltar que en 2016, se produjeron una de las mayores epidemias en cuanto a número de casos en el continente, especialmente en el cono Sur (125). Estos resultados se encuentran apoyados en las estimaciones de divergencia nucleotídica sobre pares de secuencias que mostró la mayor divergencia (2,71%) dentro de los grupos comparados. En cuanto a la presencia de dos grupos, se buscó explicación en la temporalidad a fin de distinguir si los linajes circularon en tiempos o meses distintos, sin embargo fue visto que co-circularon en fechas muy próximas, por lo que se puede deducir que en el año 2016 hubo coexistencia de distintos linajes de DENV-1. Por otro lado, en cuanto a la distribución geográfica no se pudo establecer relación debido a que las muestras pertenecían a pacientes de Asunción y el Departamento Central. La co-circulación y coexistencia de distintos linajes es un fenómeno comúnmente registrado en países de carácter endémico para el dengue (126). Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio que se encontraban dentro del grupo IV y V, se agruparon dentro del Linaje 6 (L6) y el Linaje 1 (L1) respectivamente de un estudio realizado en Brasil por *Pinheiro y col.* (127). En este estudio observaron un dominio en la circulación a lo largo del tiempo del linaje L6 (2008-2015) explicado por la inmunogenicidad viral reducida y la consecuente mayor viremia, aumentando la probabilidad de transmisión del linaje L6 por el vector y el aumento del **fitness epidemiológico**. También describieron que el linaje L1 desencadenaba una mejor respuesta inmune, evitando la propagación más amplia de este linaje (127). El **fitness viral** está definido por la capacidad de un virus para producir una progenie infecciosa en un ambiente dado, por otro lado el **fitness epidemiológico** es la capacidad de un virus de ser dominante en una región determinada (128).

A diferencia del estudio anteriormente mencionado, en base a los resultados de las muestras analizadas en este trabajo, no se detectó una persistencia a lo largo del tiempo de DENV-1 pertenecientes al grupo IV (L6), debido a que no fue identificado este grupo en muestras de 2018. Esto llevaría a plantear que este linaje posiblemente fue reemplazado o bien extinto. En algunos casos ciertos linajes o variantes que han circulado por un periodo de tiempo, son capaces de generar respuesta inmune en la población, lo que podría dar respuesta a que muchos linajes finalmente han desaparecido debido a una disminución en la replicación o la transmisión de los

mismos (129). Por otro lado, los linajes de un mismo tipo pueden presentar diferencias en la transmisibilidad, virulencia y propiedades antigénicas, algunas de las cuales podrían estar relacionadas con un mayor potencial epidémico (130). Además se puede mencionar que la diferencia en el *fitness* replicativo es un factor principal en el reemplazo de clados en las epidemias de DENV (131). Es decir que aquellas que tengan mejor replicación tienen mayor posibilidad de presentar predominio en la circulación en un tiempo determinado (132,133).

De acuerdo a los análisis con secuencias depositadas hasta la fecha en cuanto a DENV-1 circulante en 2018 podría derivar a partir de aquellas que se encontraban circulando en el 2016 y continuaron su circulación en los años posteriores. Sin embargo, estos datos no se encuentran apoyados por las evidencias, ya que en 2017 según datos de DGVS se registraron muy pocos casos de dengue en todo país, casi todas ellos atribuidos a DENV-1, resaltando que la mayor parte de los casos fueron reportados en la última parte del año: 24/616 (SE49), 28/616 (SE50), 27/616 (SE51), y aproximadamente 10% (67/616) de los casos reportados pertenecían a la última semana del 2017 (SE52) (85,134–136), por lo que se puede decir que aquellas que circularon durante el último periodo de ese año serían las que se encontraban en predominio en 2018, además solo en la primera semana de 2018 (SE1) fueron descritos los 90 casos de DENV-1 en el país (137). Otra posible explicación es que el DENV-1 haya derivado de los linajes que previamente habían circulado en Argentina.

Se realizó un análisis de las secuencias aminoacídicas correspondientes a la proteína de la envoltura de DENV-1, mencionando que esta proteína se encuentra conformada por 495 aminoácidos (17). Se observó que gran parte de los aminoácidos se encontraban conservados en la secuencia proteica. Sin embargo, pudo ser identificada la presencia de determinadas sustituciones en algunas posiciones.

Entre los resultados llamativos se puede mencionar que cada grupo diferenciado en el árbol filogenético presentó una firma aminoacídica característica en algunas regiones de la proteína de la envoltura (Tabla 4.6). En su mayoría estas variaciones estuvieron dadas en el dominio III (aminoácidos comprendidos entre las posiciones 295 a 392). Este dominio se encuentra involucrado en el reconocimiento de receptores celulares, además fue identificado como el principal blanco de anticuerpos neutralizantes. Por ello, las sustituciones en este dominio podrían modificar tanto las

propiedades estructurales como antigénicas de DENV alterando la inmunogenicidad de la partícula viral, afectando finalmente a la patogenicidad además de determinar la especificidad del receptor, el tipo de vector, el tropismo del huésped y de la célula (17,35,76,126,138).

Ciertas sustituciones observadas en sitios particulares ya fueron descritas en estudios anteriores. En cuanto a la variación en el dominio I, en la posición E₃₇, se observó el aminoácido aspartato solo en dos de las secuencias incluidas en el estudio, las demás presentaban el aminoácido asparagina. Además en la posición E₂₉₇ se observó el aminoácido treonina solo en dos secuencias y en las demás la presencia de metionina, esto se encuentra en concordancia con el árbol filogenético construido. Ambas secuencias se encontraban en el mismo grupo (AB111065_1999 y AF514878_2000). Las sustituciones mencionadas, no han sido observadas en las secuencias descritas desde el año 2000 hasta el año 2018 por lo que se puede suponer que este grupo fue extinto como lo señalan estudios anteriores (45,124,139).

En la posición E₂₃₅ del dominio II se observó una predominancia del aminoácido aspartato a excepción de 2 secuencias que contaban con la presencia de glutamato en dicha posición. Estas últimas se encontraban dentro del grupo IV sub-grupo IV-a. Este grupo también fue descrito en un estudio de cepas circulantes en Uruguay en el 2016.

En el dominio III se observó la sustitución K→R en E₃₂₅ y E₃₆₁ en tres muestras que estaban agrupadas en el grupo IV (sub-grupo IV-a), la sustitución E₃₆₁ fue descrita en DENV-1 de Brasil circulantes entre 2014 y 2015, así como aislados en Uruguay en 2016 (140). Los cambios en estos sitios corresponden posiciones de la cresta lateral del dominio III y que fueron caracterizados como sitios de reconocimiento para el anticuerpo monoclonal (MAb) DENV1-E106 capaz de neutralizar los cinco genotipos DENV-1 y con actividad terapéutica en ratones (141,142).

Se detectaron cuatro sustituciones: E₃₃₈ (S→L) y E₃₉₄ (K→R) del dominio III, E₄₂₈ (V→L), E₄₃₆ (V→I) presente en la región *Stem*. Los reemplazos mencionados fueron capaces de diferenciar dos linajes, aquellas que se encontraban en el grupo I y V (Linaje 1): S338, R394, V428 y V436; y las del grupo IV (Linaje 6): L338, K394, L428 e I436, estos hallazgos son coincidentes con estudios anteriores que han

demostrado que los cambios en estas posiciones pueden distinguir o diferenciar a los linajes (127,143).

Respecto a ciertas modificaciones como E₃₃₈ (S→L) en la que se evidenció un cambio de aminoácidos con propiedades distintas, en el modelado de la proteína pudo observarse que este aminoácido se encuentra expuesto en el dominio III. Cambios como estos podrían ser significativos en cuanto a disminuir la exposición de ciertos residuos de aminoácidos lo cual podría afectar la neutralización por parte de los anticuerpos. En contrapartida, la modificación en E₃₃₉ (T→I) presentó cambios de aminoácidos con propiedades similares. Teniendo en cuenta que la respuesta inmune presenta la característica de alta especificidad, podría darse que ante la presencia de un cambio de aminoácido o alguna sustitución podría verse afectada la respuesta inmune ante el cambio en la configuración de la proteína. Cabe resaltar que los cambios en el dominio III en las posiciones E₃₃₈ y E₃₃₉, fueron descritos en el estudio de *Bell et. al.* en el que se demostró que las sustituciones en estas posiciones afectaban la neutralización viral (144).

En cuanto a los cambios en la región del tallo, las posiciones E₄₂₈ y E₄₃₆ se encuentran relacionadas al mecanismo de fusión del virión maduro con la membrana para la salida del mismo hacia el exterior. Los cambios en estas posiciones podrían estar relacionados a salida del virus en menor tiempo si los cambios mejoran el contacto con la membrana celular, lo que conlleva a un mayor número de partículas virales en circulación (18,115).

Teniendo en cuenta los hallazgos de este estudio son necesarios continuar otros análisis nucleotídicos como los análisis filogeográficos así como los de tipo *Molecular clock* para establecer los eventos de introducción así como el relacionamiento con antecesores. De este modo se podrían aportar datos en cuanto a caracterización molecular y vigilancia epidemiológica de este virus circulante de manera endémica en el país.

6 CONCLUSIONES

- Se detectó la circulación de DENV-1 en Asunción y el Departamento Central en distintos años.
- El análisis filogenético basado en la secuencia del gen de la proteína E mostró que los DENV-1 circulantes en Paraguay pertenecían al genotipo V.
- La presencia de cinco grupos distintos demostró la variabilidad genética del DENV-1 circulante en el Paraguay.
- En el año 2016 fue evidenciada la circulación de dos grupos diferentes dentro del genotipo V de DENV-1.
- Se sugirió la posibilidad de varios eventos de introducción de DENV-1 en distintos años que podría explicar la variabilidad en la circulación.
- Las variaciones aminoacídicas presentadas en determinadas posiciones de la secuencia de la proteína E fueron capaces de diferenciar los distintos grupos filogenéticos.
- Ciertos cambios en algunas posiciones descritas a nivel de secuencia de aminoácidos en la proteína E de DENV-1 podrían afectar al proceso de neutralización viral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hilgenfeld R, Vasudevan SG, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Dengue and Zika Control and antiviral treatment Strategies*. Vol. 1062. Singapore: Springer; 2018. 1–375 p.
2. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):480–96.
3. Weaver SC, Reisen WK. Present and Future Arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010;85(2):328–45.
4. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017;98:2–3.
5. Guzmán G, Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*. 2004;8:69–80.
6. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):712–23.
7. Solomon T, Mallewa M. Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect*. 2001;42(2):104–15.
8. PMP. Biodiversidad y enfermedades transmitidas por vectores. Vol. 10, *Boletín Chemotecnica*. 2011. p. 1–7.
9. Jaenisch, T. Wills B. Results from the DENCO study. TDR/WHO Expert Meeting on Dengue Classification and Case Management. Implications of the DENCO study. WHO. Geneva; 2008.
10. WHO. WHO. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization. France; 2009. p. 1–147.
11. del Ángel RM. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestad*. 2006;25(31):38–43.
12. OMS. OMS. *Dengue Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. Organización Mundial de la Salud. La Paz, Bolivia; 2010. p. 1–152.
13. WHO. *Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases*. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 2017. 1–86 p.
14. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002;10(2):100–3.
15. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Nathan MB, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:S7-16.
16. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):122–9.
17. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313–9.
18. Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J Virol*. 2013;87(4):2287–93.

19. Boonnak K, Slike B, Burgess T, Maso R, Wu S-J, Sun P, et al. Role of Dendritic Cells in antibody dependent enhancement of dengue infection. *J Virol.* 2008;82(8):3939–51.
20. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(23):11418–31.
21. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko JD. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997;3(8):866–71.
22. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003;4(7):723–8.
23. Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *J Virol.* 2006;80(6):2976–86.
24. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann M, Pletnev S V., Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717–725.
25. Yu I-MY, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008;319:1834–1837.
26. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* (80-). 2010;328:745–9.
27. 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;9(3):362–7.
28. Chen R, Vasilakis N. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses.* 2011;3:1562–608.
29. Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine.* 2005;30(6):359–65.
30. Castro-Mussot ME, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Salazar MI. Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gac Med Mex.* 2013;149:531–40.
31. Sierra B, Kouri G, Guzman M. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol.* 2007;152(3):533–42.
32. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Chairunsri A, Sawasdivorn S, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9(7):921–7.

33. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006;176:3821–3829.
34. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *Inmunol Med Microbiol.* 2008;53:287–99.
35. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue virus. *Adv Virus Res.* 2003;60:421–67.
36. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the Flavivirus life Cycle. *Microbiology.* 2005;3:13–22.
37. Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol.* 2007;40:50–4.
38. Bashir AB, Mohammed BA, Saeed OK, Ageep AK. Thrombocytopenia and bleeding manifestations among patients with dengue virus infection in Port Sudan, Red Sea State of Sudan. *J Infect Dis Immunity.* 2015;7(2):7–13.
39. Salvo MA, Aliota MT, Moncla LH, Velez ID, Trujillo AI, Friedrich TC, et al. Tracking dengue virus type 1 genetic diversity during lineage replacement in an hyperendemic area in Colombia. *PLoS One.* 2019;14(3):e0212947.
40. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 1992;122:281–8.
41. Holmes EC. Patterns of Intra- and Interhost Nonsynonymous Variation Reveal Strong Purifying Selection in Dengue Virus. *J Virol.* 2003;77(20):11296–8.
42. Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM, et al. Genome-Wide Patterns of Intrahuman Dengue Virus Diversity Reveal Associations with Viral Phylogenetic Clade and Interhost Diversity. *J Virol.* 2012;86(16):8546–58.
43. 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;154:175–81.
44. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003;3:19–28.
45. Thu HM, 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;336:163–72.
46. 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;301:148–56.
47. Rico-Hesse R. Molecular Evolution and Distribution of Dengue Viruses Type 1 and 2 in Nature. *Virology.* 1990;174:479–93.
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. Méndez JA, Bernal M del P, de Calvache D, Boshell J. Genotipificación y análisis filogenético de cepas colombianas del virus Dengue tipo 2. *Nov - Publicación Científica*. 2003;1(1):37–43.
50. Kroschewski H, Sagripanti J-L, Davidson AD. Communication Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity. *J Gen Virol*. 2009;90:2457–61.
51. Manakkadan A, Joseph I, Prasanna RR, Kunju RI, Kailas L, Sreekumar E. Lineage shift in Indian strains of Dengue virus serotype-3 (Genotype III), evidenced by detection of lineage IV strains in clinical cases from Kerala. *Virol J*. 2013;10(37).
52. Araújo JM, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Zanotto PMDA, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*. 2009;9:716–25.
53. Sharma S, Dash PK, Agarwal S, Shukla J, Parida MM, Rao PVL. Comparative complete genome analysis of dengue virus type 3 circulating in India between 2003 and 2008. *J Gen Virol*. 2011;92:1595–600.
54. Ospina MC, Diaz FJ, Osorio JE. Prolonged co-circulation of two Distinct Dengue Virus Type 3 Lineages in the Hyperendemic Area of Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(3):672–8.
55. Vasilakis N, Weaver SC. The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: *Advances in Virus Research*. Galveston, Texas: Elsevier Inc.; 2008. p. 1–76.
56. 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.
57. Rey-Caro LA, Villar-Centeno LÁ. Linfocitos atípicos en dengue: papel en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. *Rev Cienc Salud*. 2012;10(3):323–35.
58. Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I. Biología y métodos diagnóstico del dengue. *Rev Biomédica*. 2005;16(2):113–37.
59. Menon PR, Krishnan C, Sankar J, Gopinathan KM, Mohan G. A Child with Serious Chikungunya Virus (CHIKV) Infection Requiring Intensive Care, After an Outbreak. *Indian J Pediatr*. 2010;77:1326–8.
60. Crespo Ortiz M del P. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Colomb Med*. 2000;31(3):135–50.
61. WHO. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. 3rd ed. Vol. 3, World Health Organization. Geneva: TDR/World Health Organization; 2009. 1–42 p.
62. Fernández R, Vázquez S. Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(3):347–351.
63. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, Pupo M, Ruiz D, Serrano T, 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;11:256–62.

64. Vázquez S, Pérez AB, Ruiz D, Rodríguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005;33:132–7.
65. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Thi V, Hang T, Sekaran SD, 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):e811.
66. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzmán MG. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK 2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bull.* 2005;29:49–57.
67. Vaidya SR, Brown DWG, Jin L, Samuel D, Andrews N, Brown KE. Development of a focus reduction neutralization test (FRNT) for detection of MuV neutralizing antibodies. *J Virol Methods.* 2010;163:153–6.
68. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj 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;181:2–9.
69. 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;66:524–8.
70. Dos Santos WH, Ramos Silva Poloni TR, Souza KP, Menjon Muller VD, Tremeschin F, Christensen Nali L, et al. A Simple One-Step Real-Time RT-PCR for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Med Virol.* 2008;80:1426–33.
71. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2116.
72. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (80-).* 2016;353:823–6.
73. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1102–8.
74. Bardina S V, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science (80-).* 2017;356:175–80.
75. PAHO. Plan continental de ampliación e intensificación del combate a *Aedes aegypti*. Pan American Health Organization. Washington, DC; 1997. p. 124–30.
76. 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;303:110–9.
77. OPS. Dengue en las Américas. 1980-1987. *Boletín Epidemiológico OPS.* 1989;10(1):1–16.

78. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2007;6(5):1–2.
79. MSPyBS. Evaluación de la estrategia de gestión integrada de dengue (EGIDENGUE PARAGUAY). Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2011. 1–76 p.
80. MSPyBS. Guía Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2015. 1–375 p.
81. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2013;50:1–17.
82. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2016;52:1–15.
83. Rojas A, Cardozo F, Cantero C, Stittleburg V, López S, Bernal C, et al. Characterization of dengue cases among patients with an acute illness, Central Department, Paraguay. *PeerJ*. 2019;7:e7852.
84. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2016;48:1–34.
85. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2017;52:1–30.
86. Zhang C, Mammen MP, 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;79(24):15123–30.
87. 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;20(10):1650–8.
88. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):138–46.
89. Ramos-Castañeda J, Barreto dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo M, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005224.
90. Cummings DAT, Irizarry RA, Huang NE, Endy TP, Nisalak A, Ungchusak K, et al. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand. *Nature*. 2004;427:344–7.
91. Adams B, Holmes EC, Zhang C, Mammen MP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, et al. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *PNAS*. 2006;103(38):14234–14239.
92. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, Chikungunya virus, and Dengue virus. *J Clin Infect Dis*. 2016;63:1584–90.

93. Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Arriaga JB, Green A, James SL, et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science* (80-). 2015;349(6254):1338–43.
94. Thu HM, Myint TT, Khin KK, Aaskov J. Myanmar Dengue Outbreak Associated with Displacement of Serotypes 2, 3, and 4 by Dengue 1. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):593–7.
95. 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;230:244–51.
96. Avilés 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;147(11):2075–87.
97. Diaz Aquino JDJ, Tang W, 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;137:266–70.
98. Villabona-Arenas CJ, de Andrade Zanotto PM. Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. *PLoS One.* 2013;8(5):e62649.
99. Afreen N, Naqvi IH, Broor S, Ahmed A, Parveen S. Phylogenetic and molecular clock analysis of dengue serotype 1 and 3 from New Delhi, India. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141628.
100. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig en Discapac.* 2013;2(2):70–8.
101. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Jose M, Davila V, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1295–7.
102. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Development of an Internally Controlled Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Pan-Dengue Virus Detection and Comparison of Four Molecular Dengue Virus Detection Assays. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2172–81.
103. Weber C, Hartig A, Hartmann RK, Rossmannith W. Playing RNase P Evolution: Swapping the RNA Catalyst for a Protein Reveals Functional Uniformity of Highly Divergent Enzyme Forms. *PLOS Genet.* 2014;10(8):1–12.
104. Parameswaran P, Wang C, Trivedi SB, Eswarappa M, Montoya M, Balmaseda A, et al. Intra-host Selection Pressures Drive Rapid Dengue Virus Microevolution in Acute Human Infections. *Cell Host Microbe.* 2017;22(3):400–10.
105. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135–45.
106. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1160–6.

107. Fonseca V, Libin PJK, Theys K, Faria NR, Nunes M, Restovic MI, et al. A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):e0007231.
108. Hordijk W, Gascuel O. Improving the efficiency of SPR moves in phylogenetic tree search methods based on maximum likelihood. *Bioinformatics*. 2005;21(24):4338–47.
109. Salemi M, Vandamme A-M. *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Second. Lemey P, editor. New York: Cambridge University Press; 2009. 1–723 p.
110. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Quang Minh B. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating Maximum-Likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268–74.
111. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547–9.
112. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:344–50.
113. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(40).
114. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*. 2017;27:14–25.
115. Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and its Implications for Membrane Fusion. *J Virol*. 2009;83(9):4338–44.
116. MSPyBS. *Boletín Epidemiológico República del Paraguay*. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2011;49:1–22.
117. MSPyBS. *Boletín Epidemiológico República del Paraguay*. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2018;52:1–36.
118. MSPyBS. *Boletín Epidemiológico República del Paraguay*. Dir Gen Vigil la Salud. 2012;51:1–11.
119. MSPyBS. *Boletín Epidemiológico República del Paraguay*. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2019;52:1–34.
120. Avilés 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;147:2075–87.
121. Ito M, Yamada KI, Takasaki T, Pandey B, Nerome R, Tajima S, et al. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: Possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med*. 2007;14(4):233–44.
122. Barrero PR, Mistchenko AS. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res*. 2004;101:135–45.

123. 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;29(6):1533–43.
124. de Bruycker-Nogueira F, Mir D, Barreto dos Santos F, Bello G. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect Genet Evol.* 2016;45:454–60.
125. PAHO. Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country. PAHO. 2017.
126. 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;157(11):2061–73.
127. Pinheiro TM, Mota MT de O, Watanabe ASA, Biselli-Périco JM, Drumond BP, Ribeiro MR, et al. Viral immunogenicity determines epidemiological fitness in a cohort of DENV-1 infection in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5):1–25.
128. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science (80-).* 2015;350:217–21.
129. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853–9.
130. Quiner CA, Parameswaran P, Ciota AT, Ehrbar DJ, Dodson BL, Schlesinger S, et al. Increased Replicative Fitness of a Dengue Virus 2 Clade in Native Mosquitoes: Potential Contribution to a Clade Replacement Event in Nicaragua. *J Virol.* 2014;88(22):13125–34.
131. Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin Virol.* 2012;2:538–45.
132. Lambrechts L, Fansiri T, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, et al. Dengue-1 Virus Clade Replacement in Thailand Associated with Enhanced Mosquito Transmission. *J Virol.* 2011;86(3):1853–61.
133. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Johari J, Shu MH, Danlami MB, et al. Dengue virus type 1 clade replacement in recurring homotypic outbreaks. *BMC Evol Biol.* 2013;13:213.
134. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dir Gen Vigil la Salud. 2017;49:1–23.
135. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dir Gen Vigil la Salud. 2017;50:1–29.
136. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dir Gen Vigil la Salud. 2017;51:1–21.
137. MSPyBS. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. Dirección General de Vigilancia de la Salud. 2018;1:1–19.

138. Carneiro AR, Cruz ACR, Vallinoto M, de Vasconcelos Melo D, Ramos RTJ, Medeiros DBA, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):805–12.
139. de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RMR, da Costa Faria NR, Simões JBS, Nunes PCG, de Filippis AMB, et al. Insights Of The Genetic Diversity Of DENV-1 Detected In Brazil In 25 Years: Analysis of the Envelope Domain III allows Lineages Characterization. *Infect Genet Evol.* 2015;34:126–36.
140. Bruycker-Nogueira F De, Manuele T, Souza A, Chouin-Carneiro T, Rodrigues N, Santos JB, et al. DENV-1 Genotype V in Brazil: Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. *Sci Rep.* 2018;8:1–8.
141. Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000823.
142. Shrestha B, Austin SK, Dowd KA, Prasad AN, Youn S, Pierson TC, et al. Complex phenotypes in mosquitoes and mice associated with neutralization escape of a Dengue virus type 1 monoclonal antibody. *Virology.* 2012;427:127–34.
143. de Bruycker-Nogueira F, Alves Souza TM, Chouin-Carneiro T, Rodrigues da Costa Faria N, Santos JB, Torres MC, et al. DENV-1 Genotype V in Brazil: Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. *Sci Rep.* 2018;8:17160.
144. Bell SM, Katzelnick L, Bedford T. Dengue genetic divergence generates within-serotype antigenic variation, but serotypes dominate evolutionary dynamics. *Elife.* 2019;8:e42496.
145. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Jose M, Davila V, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Technical Appendix.* :1–4.

ANEXOS

1: Aprobación IICS Código P39/2018.



Universidad Nacional de Asunción
 RECTORADO
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
 COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
 COMITÉ de ÉTICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : ALEJANDRA ROJAS
 C.C. : WAGGONER J., AREVALO DE GUILLEN Y., BERNAL C., CANTERO C.,
 ACOSTA M.E., ARIA L., CARDOZO F., PAEZ M., MENDOZA L.
 Código : P39/2018
 Fecha : 20/09/2018

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“Detección y caracterización de infecciones por flavivirus y alfavirus en casos agudos con sospecha de arbovirosis o enfermedades neurológicas, Departamento Central, Paraguay”.

Ha sido aceptado:

COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
 Dra. Vivian Giménez
 Coordinadora

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACION (CEI)
 Dra. Eva Nara
 Coordinadora

Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA

Anexo 2: Aprobación de la Universidad de Emory IRB00097089

6/27/2017

<https://research.emory.edu/EmoryDoc/0H878A2NSIF84LCFU5UWVF3VHDE/FromString.html>



Institutional Review Board

TO: Jesse Waggoner, MD
 Principal Investigator
 SOM: Medicine: Infectious Dis

DATE: June 27, 2017

RE: **Expedited Approval**
 IRB00097089
 Detection and Characterization of Arbovirus Infections in Acutely-Ill Patients at the Central Department, Paraguay

Thank you for submitting a new application for this protocol. This research is eligible for expedited review under 45 CFR.46.110 and/or 21 CFR 56.110 because it poses minimal risk and fits the regulatory categories F(2a), F(2b), and F(7) as set forth in the Federal Register. The Emory IRB reviewed it by expedited process on 6/27/2017 and granted approval effective from 6/27/2017 through 6/26/2018. Thereafter, continuation of human subjects research activities requires the submission of a renewal application, which must be reviewed and approved by the IRB prior to the expiration date noted above. Please note carefully the following items with respect to this approval:

- This study meets the criteria for permissible clinical research with children as set forth at 45 CFR 46.404/21 CFR 50.51. One parent or guardians' signed permission is sufficient to enroll minor subjects. Parent or guardian permission must be obtained, as well as assent of the child, as per 45 CFR 46.408/21 CFR 50.55 and Emory's age-based assent guidelines, which are outlined in your approved assent form.
- The IRB determined that the use of the pGOLD Arbovirus Assay and the ZCD Assay in this protocol meet the criteria for exemption from the IDE requirement per FDA regulations.

The following documents were included in this review:

- Arboviral Infections in Paraguay Protocol (Protocol Version: 1.0; Protocol Date: 25 May 2017)
- Consent Form (English) (Version Date: 05/25/2017)
- Consent Form (Spanish) (Fecha de la versión: 25/05/2017)
- Assent Form (English) (Version 1.0; version date: 05/16/2017)
- Assent Form (Spanish) (Versión: 1.0; fecha de versión: 16/05/2017)
- Questionnaires and Data Sheets (uploaded on 6/1/2017)
- 2017 - Nat Med - DENV-ZIKV Detection on a Nanotechnology Platform
- 2016 - EID - ZCD Assay Development

Any reportable events (e.g., unanticipated problems involving risk to subjects or others, noncompliance, breaches of confidentiality, HIPAA violations, protocol deviations) must be reported to the IRB according to our Policies & Procedures at www.irb.emory.edu, immediately, promptly, or periodically. Be sure to check the reporting guidance and contact us if you have questions. Terms and conditions of sponsors, if any, also apply to reporting.

Before implementing any change to this protocol (including but not limited to sample size, informed consent, study design, you must submit an amendment request and secure IRB approval.

In future correspondence about this matter, please refer to the IRB file ID, name of the Principal Investigator, and study title. Thank you

<https://research.emory.edu/EmoryDoc/0H878A2NSIF84LCFU5UWVF3VHDE/FromString.html>

1/2

Anexo 3: Aprobación IICS Código P13/2019



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTIFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO

A : CESAR CANTERO
C.C. : ALEJANDRA ROJAS, JESSE WAGGONER , YVALENA AREVALO
DE GUILLÉN, FATIMA CARDOZO, CYNTHIA BERNAL,
MAGALY MARTINEZ
Código : P13/2019
Fecha : 19/06/2019

Por la presente informamos que el protocolo de investigación remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

**"VARIABILIDAD GENETICA DEL VIRUS DEL DENGUE TIPO 1 (DENV-1)
CAUSANTES DE INFECCIONES HUMANAS ENTRE 2011 Y 2019 EN EL
DEPARTAMENTO CENTRAL, PARAGUAY".**




COMITÉ CIENTIFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez
Coordinadora

Ha sido aceptado




COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora

Anexo 4: Secuencias diana de las reacciones de rRT-PCR para cada DENV correspondiente a ácidos nucleicos sintéticos utilizados como controles positivos y controles para cuantificación viral.

Virus	Secuencia 5'→3'	Región
DENV-1	GAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAGAC GGGTCGACCGTCTTTCAATATGCTGAAACGCGCGAGA AACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGAT TCTCAAAAGGAT	5' UTR- Cápside
DENV-2	AGAGCAGATCTCTGATGAATAACCAACGAAAAAAGGC GAGAAGTACGCCTTTCAATATGCTGAAACGCGAGAGA AACCGCGTGTCAACTGTGCAACAGCTGACAAAGAGAT TCTCACTTGGAAATGCTGCAAGGAC	5' UTR- Cápside
DENV-3	AGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAGAAGAC GGGAAAACCGTCTATCAATATGCTGAAACGCGTGAGA AACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGAT TCTCAAGAGGAC	5' UTR- Cápside
DENV-4	TCGGAAGCTTGCTTAACACAGTTCTAACAGTTTGTAA ATAGAGAGCAGATCTCTGGAAAAATGAACCAACGAAA AAAGGTGGTTAGACCACCTTTCAATATGCTGAAACGC GAGAGAAACCGGTATCAACCCCTCAAGGGTTGGTGA AGAGATTCTCAACCG	5' UTR- Cápside

Obs.: UTR del inglés región no traducida

Anexo 5: Cebadores (primers) utilizados para detección y amplificación de regiones específicas del DENV, CHIKV y ZIKV que incluyen el ensayo. Adaptado del Apéndice Técnico Tabla 1: Primers y sondas que incluyen en el ensayo ZCD (Waggoner y col., 2016) (145).

	Secuencia 5' → 3'	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (nM)
Cebadores Dengue				
Den1-2-3 F-long	CAGATCTCTGATGAACAACCAACG	86–109	5' UTR-Cápside	350
Den1 5' R New Down	TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC	179–199	5' UTR-Cápside	300
Den2 F-long C → T	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG	87–110	5' UTR-Cápside	350
Den2 R2	AGTTGACACGCGGTTTCTCT	152–171	5' UTR-Cápside	350
Den2 R2 A → G	AGTCGACACGCGGTTTCTCT	152–171	5' UTR-Cápside	350
Den3 F-long C → T	CAGATTTCTGATGAACAACCAACG	85–108	5' UTR-Cápside	300
Den4 F1	GATCTCTGGAAAAATGAAC	81–99	5' UTR-Cápside	450
Den4 R1	AGAATCTCTTCACCAACC	173–190	5' UTR-Cápside	450
Cebadores Chikungunya				
Chik_D_F2Y	CATCTGCAC ^Y CAAGTGACCA	2578–2598	nsP2	300
Chik_D_R2	GCGCATTTTGCCTTCGTAATG	2654–2674	nsP2	300
Cebadores Zika				
Zika_F1	CAGCTGGCATCATGAAGAAYC	7332–7352	NS4B	300
Zika R1 T → C	CACTTGTC ^C CATCTTCTTCTCC	7411–7432	NS4B	300
Zika R1 C → T	CACCTGT ^C CCATCTTTTTTCTCC	7411–7432	NS4B	300

*Posición genómica basada en las secuencias de cepas de referencias: DENV-1 cepa U.S/Hawaii/1944 (código de acceso Gen Bank EU848545.1), DENV-2 cepa Nueva Guinea C (código de acceso Gen Bank AF038403.1), DENV-3 cepa H87 (código de acceso Gen Bank M93130.1) y DENV-4 cepa H241 (código de acceso Gen Bank AY947539.1), CHIKV cepa S27 prototipo Africano (código de acceso Gen Bank AF369024.2), ZIKV cepa MR766-NIID (código de acceso Gen Bank LC002520.1).
Obs.: Y=C+T; UTR del inglés región no traducida; nsP2: proteína no estructural 2; NS4B: proteína no estructural 4B.

Anexo 6: Sondas *TaqMan* utilizadas para detección de regiones específicas del DENV, CHIKV y ZIKV que incluyen el ensayo. Adaptado del Apéndice Técnico Tabla 1: Primers y sondas que incluyen en el ensayo ZCD (Waggoner y col., 2016) (145).

	5' Fluoróforo	Secuencia 5' → 3'	3' Quencher	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (nM)
Sondas DENV–Ensayo pan-DENV						
Sonda A	FAM	CTCGCGCGTTTCAGCATAT	BHQ-1 plus	136-154	5' UTR-Cápside	100
Sonda B	FAM	CTCTCGCGTTTCAGCATAT	BHQ-1 plus	137-155	5' UTR-Cápside	100
Sonda C	FAM	CTCTCACGTTTCAGCATATTG	BHQ-1 plus	135-155	5' UTR-Cápside	100
Sonda D	FAM	CTCACGCGTTTCAGCATAT	BHQ-1 plus	135-153	5' UTR-Cápside	100
Sondas CHIKV						
Chik_D_Probe2	Cal Fluor 610	GCGGTGTACACTGCCTGTGACYGC	BHQ-2	2614-2637	nsP2	100
Sondas ZIKV						
Zika_Pr1	Quasar 705	CYGGTTGTGGATGGAATAGTGG	BHQ-2	7355-7373	NS4B	100

*Posición genómica basada en las secuencias de cepas de referencias: DENV-1 cepa U.S/Hawaii/1944 (código de acceso Gen Bank EU848545.1), DENV-2 cepa Nueva Guinea C (código de acceso Gen Bank AF038403.1), DENV-3 cepa H87 (código de acceso Gen Bank M93130.1) y DENV-4 cepa H241 (código de acceso Gen Bank AY947539.1), CHIKV cepa S27 prototipo Africano (código de acceso Gen Bank AF369024.2), ZIKV cepa MR766-NIID (código de acceso Gen Bank LC002520.1). Y=C+T. BHQ: Black Hole Quencher® (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA).

Anexo 7: Cebadores (primers) y sondas TaqMan utilizados para detección y amplificación del control interno RNasa P (102).

Cebadores RNasa P		
	Secuencia 5' → 3'	Concentración final en la reacción (nM)
RNase P sentido	AGATTTGGACCTGCGAGCG	100
RNase P antisentido	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	100

Sonda RNasa P				
	5' Fluor	Secuencia 5' → 3'	3' Quencher	Concentración final en la reacción (nM)
RNasa P	Cal Fluor 560	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	BHQ-1	50

Anexo 8: Cebadores (*primers*) utilizados para detección y amplificación de regiones específicas del DENV que incluyen el ensayo de Waggoner y col., 2013 (71).

	Secuencia 5' → 3'	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (nM)
Cebadores Dengue				
Den1-2-3 F-long	CAGATCTCTGATGAACAACCAACG	86–109	5' UTR-Cápside	350
Den1 5' R New Down	TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC	179–199	5' UTR-Cápside	300
Den2 F-long C → T	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG	87–110	5' UTR-Cápside	350
Den2 R2	AGTTGACACGCGGTTTCTCT	152–171	5' UTR-Cápside	350
Den2 R2 A → G	AGTCGACACGCGGTTTCTCT	152–171	5' UTR-Cápside	350
Den3 F-long C → T	CAGATTTCTGATGAACAACCAACG	85–108	5' UTR-Cápside	300
Den4 F1	GATCTCTGGAAAAATGAAC	81–99	5' UTR-Cápside	450
Den4 R1	AGAATCTCTTCACCAACC	173–190	5' UTR-Cápside	450

Anexo 9: Sondas *Molecular Beacon* utilizadas para detección de regiones específicas del DENV que incluyen el ensayo de Waggoner y col., 2013 (71).

	5' Fluoróforo	Secuencia 5' → 3'	3' Quencher	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (nM)
Sondas DENV–Ensayo pan-DENV						
Den1 Alternate	FAM	<u>CGCGATCTTCAGCATATTGAAAGACGGTCGGATCGCG</u>	BHQ-1 plus	136-154	5' UTR- Cápside	600
Den2 Multiplex	CAL Fluor 560	<u>CGCGATCGCGTTTCAGCATATTGAAAGGCGGATCGCG</u>	BHQ-1 plus	137-155	5' UTR- Cápside	600
Den3 March	CAL Fluor 610	<u>CGCGATCCACGCGTTTCAGCATATTGATAGGATCGCG</u>	BHQ-1 plus	135-155	5' UTR- Cápside	600
Den4 March	Quasar 670	<u>CGCGATCTTTCAGCATATTGAAAGGTGGTCGATCGCG</u>	BHQ-1 plus	135-153	5' UTR- Cápside	600

BHQ: Black Hole Quencher® (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA).

Obs.: las bases subrayadas constituyen el Tallo de las Sondas Molecular Beacon

Anexo 10: Cebadores (*primers*) utilizados para la amplificación del gen que codifica para la Proteína E del DENV-1 (104).

	Secuencia 5' → 3'	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (µM)
Cebadores Dengue				
EDH1_short	TCAATATGCTGAAACGCG	147-164	C-PrM	10
DV1consen	ATGTGGAAGCAAATATCAAATGA	2633-2655	NS1	10

C: Cápside; PrM: Proteína de Membrana; E: Protína de Envoltura; NS-1: Proteína no estructural 1

Anexo 11: Cebadores (*primers*) utilizados para la secuenciación del gen que codifica para la Proteína E del DENV-1 (104).

	Secuencia 5' → 3'	Localización*	Región	Concentración final en la reacción (µM)
Cebadores Dengue				
D1_689F	GGTCTAGAAACAAGAACCGAAACATGGATG	755-784	PrM	5
AC_DV1f_1056-77	TGGACATTGAACTCTTGAAGAC	1071-1092	M-E	5
D1_CC	GAAACAGGAAGTAGTCGTACTGGGATC	1687-1713	E	5
D1_2211R	ACACCGCTGAACAGAACCCCATAYG	2186-2211	NS1	5
DV1consen	ATGTGGAAGCAAATATCAAATGA	2633-2655	NS1	5

Obs.: Y=C+T; PrM: Proteína de Membrana; E: Protína de Envoltura; NS-1: Proteína no estructural 1

Anexo 12: Base de datos de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético

Código de acceso al GenBank / Nombre	País	Año
AY726552	Myanmar	2002
KY283851	Argentina	2016
KY283852	Argentina	2016
KX768379	Argentina	2016
KX768404	Argentina	2016
KX768413	Argentina	2016
KX768409	Argentina	2016
KX768398	Argentina	2016
KX768408	Argentina	2016
KX768401	Argentina	2016
KX768395	Argentina	2016
KY283853	Argentina	2016
KT382187	Bolivia	2010
KP903772	Brasil	2013
MH401973	Brasil	2012
MH401972	Brasil	2012
KY818235	Brasil	2013
KY818233	Brasil	2012
KY818230	Brasil	2012
MH401986	Brasil	2015
MH401978	Brasil	2014
MT862894	Brasil	2018
MT862892	Brasil	2018
MT862891	Brasil	2018
MH401999	Brasil	2016
MH401995	Brasil	2016
MH401993	Brasil	2015
MH401996	Brasil	2016
MT862893	Brasil	2018
MT862890	Brasil	2018
MT862889	Brasil	2018
MT862887	Brasil	2018
MT862869	Brasil	2019
MT862868	Para	2019
MT862895	Brasil	2018
MT862878	Brasil	2018
MT862876	Brasil	2018
MH349370	Uruguay	2016
MH349372	Uruguay	2016
MH349373	Uruguay	2016
MH349371	Uruguay	2016
MH349360	Uruguay	2016
MH349367	Uruguay	2016
MH401994	Brasil	2016
MH401985	Brasil	2015
AY206457	Argentina	2000
AF514889	Argentina	2000
AF514876	Argentina	2000

GenBank Accession number	País	Año
AY277654	Argentina	2000
AY277655	Argentina	2000
AY277656	Argentina	2000
AY277657	Argentina	2000
AY277658	Argentina	2000
AY277659	Argentina	2000
AY277660	Argentina	2000
AY277661	Argentina	2000
AY277666	Argentina	2000
AY277662	Argentina	2000
AY277663	Argentina	2000
AY277664	Argentina	1999
AY277652	Argentina	1999
AY277653	Argentina	1999
KC692496	Argentina	2009
KC692497	Argentina	2009
KC692498	Argentina	2009
KC692512	Argentina	2010
KC692514	Argentina	2010
KT382187	Bolivia	2010
KC692495	Bolivia	2009
HM450085	Brasil	2000
JQ015184	Brasil	2010
JQ015185	Brasil	2010
HM450088	Brasil	2001
HM450099	Brasil	2005
HM450105	Brasil	2002
HM450103	Brasil	2007
FJ384655	Brasil	2001
AB519681	Brasil	2001
JN982362	Brasil	2010
HM450087	Brasil	2000
AY277665	Brasil	2000
KF672785	Brasil	2010
HM043709	Brasil	2009
KF719187	Brasil	2010
KF672763	Brasil	2000
KF672789	Brasil	2001
KF672783	Brasil	2002
KP858107	Brasil	2013
KP858110	Brasil	2013
KP858111	Brasil	2013
KP858112	Brasil	2013
KP858113	Brasil	2013
KP858114	Brasil	2013
KP858118	Brasil	2013
HM450083	Brasil	1999
HM450096	Brasil	2003
HM450084	Brasil	2000
HM450090	Brasil	2002
KF672768	Brasil	2010
KF672776	Brasil	1998

GenBank Accession number	País	Año
KF672777	Brasil	1998
KP903781	Brasil	2013
KP903774	Brasil	2013
KP903771	Brasil	2013
KP903775	Brasil	2013
KP903772	Brasil	2013
KP903773	Brasil	2013
KP903779	Brasil	2013
FJ850073	Brasil	2001
FJ850071	Brasil	2000
FJ850075	Brasil	2002
FJ850077	Brasil	2003
FJ850081	Brasil	2004
FJ850084	Brasil	2005
FJ850090	Brasil	2007
FJ850093	Brasil	2008
HM450077	Brasil	2007
HM450080	Brasil	1996
HM450082	Brasil	1997
AF425614	Brasil	1997
HM450097	Brasil	2004
HM450100	Brasil	2006
HM450101	Brasil	2007
AF513110	Brasil	2001
JX669463	Brasil	2010
JX669464	Brasil	2010
JX669466	Brasil	2010
JX669468	Brasil	1997
JX669469	Brasil	1997
JX669470	Brasil	1998
JX669471	Brasil	1999
JX669472	Brasil	2000
JX669473	Brasil	2001
JX669461	Brasil	2010
AF311956	Brasil	1997
AF311957	Brasil	1997
JX669465	Brasil	2010
KF672787	Brasil	2000
HM450092	Brasil	2002
HM450093	Brasil	2002
D1BR RP1	Brasil	2011
D1BR RP10	Brasil	2010
D1BR RP13	Brasil	2011
D1BR RP14	Brasil	2011
D1BR RP3	Brasil	2011
D1BR RP6	Brasil	2011
D1BR RP7	Brasil	2011
JN122281	Brasil	2011
KF672790	Brasil	2011
KF672760	Brasil	2011
HM043710	Brasil	2009
HQ696612	Brasil	2010

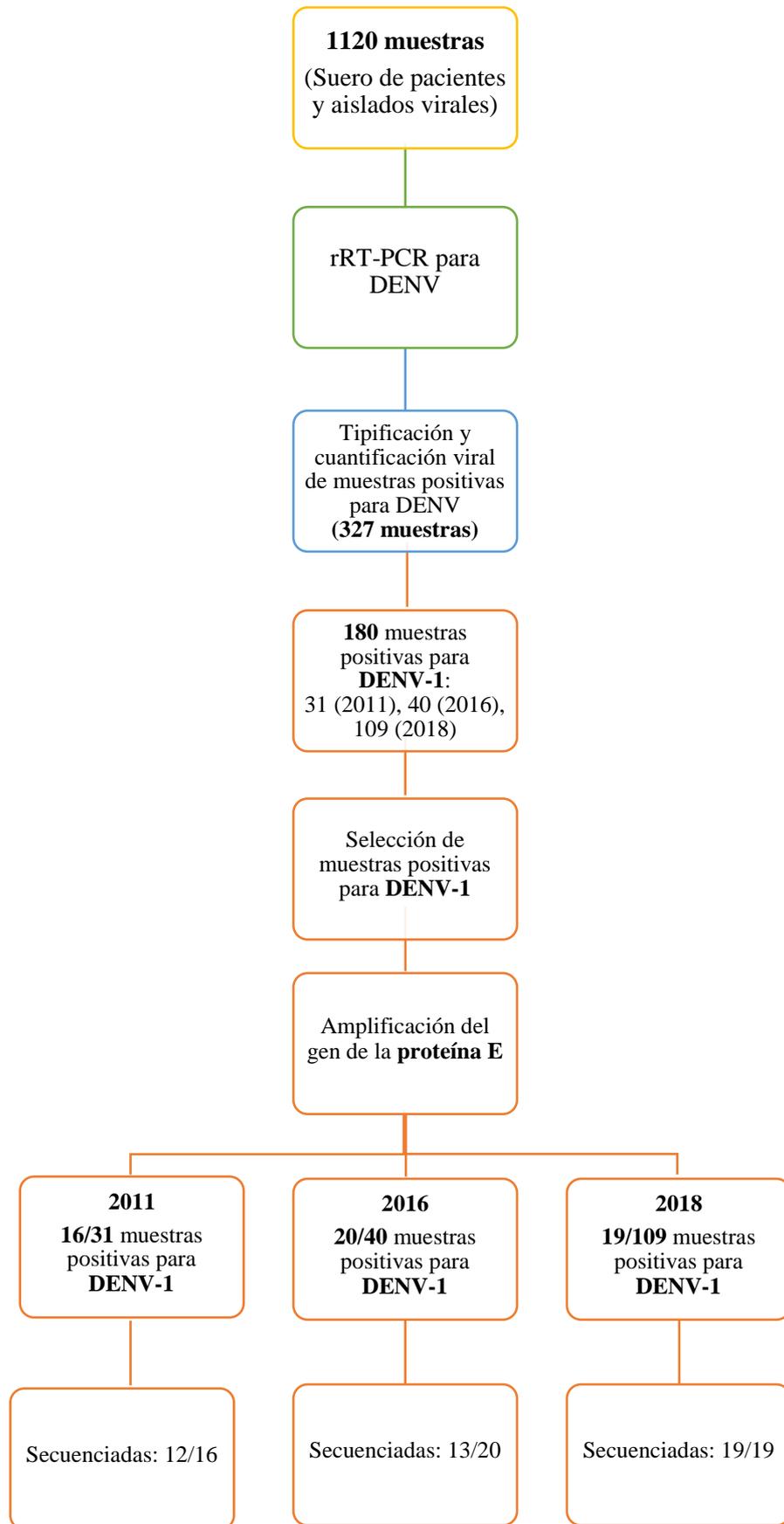
GenBank Accession number	País	Año
HQ696613	Brasil	2010
KF672759	Brasil	2010
KF672786	Brasil	2010
KF672766	Brasil	2011
KF672767	Brasil	2011
KF672784	Brasil	2011
KF672774	Brasil	1998
KF672780	Brasil	1999
KF672792	Brasil	1999
KF672782	Brasil	2000
KF672764	Brasil	2001
KF672788	Brasil	2001
AF226685	Brasil	1990
KF672773	Brasil	1997
HM450098	Brasil	2001
HM450089	Brasil	2001
HM450102	Brasil	2007
HM450104	Brasil	2008
KF444780	Brasil	2009
KF444791	Brasil	2009
KF444781	Brasil	2009
KF444782	Brasil	2009
KF444788	Brasil	2010
KF444786	Brasil	2010
KF444787	Brasil	2010
KF444792	Brasil	2010
KP188539	Brasil	2010
KP188568	Brasil	2014
KP188540	Brasil	2011
KP188542	Brasil	2011
KP188543	Brasil	2012
KP188545	Brasil	2013
GU131863	Brasil	2008
KP188539	Brasil	2010
KT438567	Brasil	2011
KT438589	Brasil	2014
KT438568	Brasil	2011
KT438572	Brasil	2011
KT438573	Brasil	2011
KT438575	Brasil	2011
KT438578	Brasil	2012
KT438582	Brasil	2012
KT438565	Brasil	2011
KT438566	Brasil	2011
HM450094	Brasil	2002
GQ868560	Colombia	1998
GQ868561	Colombia	1999
GU131948	Colombia	2001
GQ868562	Colombia	2005
GQ868563	Colombia	2006
GQ868564	Colombia	2006
GU131949	Colombia	2006

GenBank Accession number	País	Año
GQ868566	Colombia	2007
GQ868568	Colombia	2007
GQ868569	Colombia	2007
GQ868570	Colombia	2008
KJ189302	Colombia	1998
KJ189303	Colombia	1998
AF425616	Colombia	1985
AF425617	Colombia	1996
EU448414	El Salvador	2006
JX891659	El Salvador	2012
JX891660	El Salvador	2012
JX891661	El Salvador	2012
JN022598	Martinique	2008
JQ065905	México	2010
HM171569	México	2007
HM171567	México	2006
GU131956	México	2006
GU131958	México	2006
GQ868498	México	2006
GU131960	México	2007
HQ166036	México	2007
HQ166037	México	2008
GU131984	México	2008
JQ920431	México	2010
DQ016657	Nicaragua	2003
FJ898433	Nicaragua	2007
FJ810419	Nicaragua	2006
FJ562104	Nicaragua	2006
GQ199867	Nicaragua	2004
GQ199859	Nicaragua	2008
JF937644	Nicaragua	2009
JN819402	Nicaragua	2005
JF937635	Nicaragua	2009
EU596503	Nicaragua	2005
FJ898437	Nicaragua	2004
JN819403	Nicaragua	2006
KF973453	Nicaragua	2011
KF973454	Nicaragua	2012
KF973457	Nicaragua	2012
KF973460	Nicaragua	2011
AF514883	Paraguay	2000
AF514878	Paraguay	2000
AF514886	Paraguay	2000
AB111065	Paraguay	1999
Paraguay AS27 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS9 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS12 2011	Paraguay	2011
Paraguay NE16 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS19 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS41 2011	Paraguay	2011
Paraguay NE47 2011	Paraguay	2011

GenBank Accession number	País	Año
Paraguay AS53 2011	Paraguay	2011
Paraguay SL72 2011	Paraguay	2011
Paraguay MR84 2011	Paraguay	2011
Paraguay NE88 2011	Paraguay	2011
Paraguay FM90 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS95 2011	Paraguay	2011
Paraguay IT45 2016	Paraguay	2016
Paraguay AS56 2016	Paraguay	2016
Paraguay AS57 2016	Paraguay	2016
Paraguay FM60 2016	Paraguay	2016
Paraguay GU66 2016	Paraguay	2016
Paraguay YP70 2016	Paraguay	2016
Paraguay LU72 2016	Paraguay	2016
Paraguay MR89 2016	Paraguay	2016
Paraguay AS97 2016	Paraguay	2016
Paraguay LU03 2016	Paraguay	2016
Paraguay AR04 2016	Paraguay	2016
Paraguay FM12 2016	Paraguay	2016
Paraguay CA26 2016	Paraguay	2016
Paraguay NE5 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE35 2018	Paraguay	2018
Paraguay NE88 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE96 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE101 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE132 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE143 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE135 2018	Paraguay	2018
Paraguay VE171 2018	Paraguay	2018
Paraguay AS134 2018	Paraguay	2018
Paraguay FM3 2018	Paraguay	2018
Paraguay AS8 2018	Paraguay	2018
Paraguay LA12 2018	Paraguay	2018
Paraguay IT15 2018	Paraguay	2018
Paraguay AS23 2018	Paraguay	2018
Paraguay AS29 2018	Paraguay	2018
Paraguay CA37 2018	Paraguay	2018
Paraguay YP40 2018	Paraguay	2018
Paraguay NI45 2018	Paraguay	2018
Paraguay AS65 2011	Paraguay	2011
Paraguay AS67 2011	Paraguay	2011
Paraguay CA57 2011	Paraguay	2011
Paraguay LM38 2011	Paraguay	2011
Paraguay LM54 2011	Paraguay	2011
Paraguay LU25 2011	Paraguay	2011
Paraguay MR44 2011	Paraguay	2011
Paraguay VE82 2011	Paraguay	2011
Paraguay VH64 2011	Paraguay	2011
KF444909	Puerto Rico	2012
KF444916	Puerto Rico	2013
KF809752	Puerto Rico	2013
KJ189355	Puerto Rico	2012
KJ189363	Puerto Rico	2010

GenBank Accession number	País	Año
JX402208	Puerto Rico	2010
FJ390374	Puerto Rico	1995
FJ390378	Puerto Rico	1998
FJ390379	Puerto Rico	1998
FJ390380	Puerto Rico	1998
FJ410179	Puerto Rico	1994
FJ410180	Puerto Rico	1995
FJ410184	Puerto Rico	1993
FJ410186	Puerto Rico	1992
FJ410188	Puerto Rico	1996
FJ478458	Puerto Rico	1987
FJ410190	Puerto Rico	1987
EU482591	Puerto Rico	2006
KJ189350	Puerto Rico	2012
KJ189360	Puerto Rico	2010
EU482609	Venezuela	2007
FJ639735	Venezuela	1997
FJ639740	Venezuela	1998
FJ639794	Venezuela	2004
JN819410	Venezuela	2005
GU131832	Venezuela	2000
GU131834	Venezuela	2001
FJ639818	Venezuela	2006

Anexo 13: Algoritmo de selección y análisis de muestras del presente estudio



Anexo 14: Resultados obtenidos para las muestras positivas de DENV-1 seleccionadas para el estudio

Código del Estudio	Año	Tipo	Ct (DMTP)	Carga Viral (log₁₀ copias/mL)	Dpto.	Ciudad	Fecha de toma de muestra	Tipo de muestra	Secuencia obtenida del gen E
9	2011	DENV-1	24,64	8,45	Central	Asunción	26/5/2011	Aislado	Si
12	2011	DENV-1	20,33	9,75	Central	Asunción	28/4/2011	Aislado	Si
16	2011	DENV-1	20,37	9,74	Central	Ñemby	23/5/2011	Aislado	Si
19	2011	DENV-1	21,88	8,29	Central	Asunción	23/5/2011	Aislado	Si
41	2011	DENV-1	23,31	8,85	Central	Asunción	4/5/2011	Aislado	Si
53	2011	DENV-1	20,92	9,58	Central	Asunción	4/4/2011	Aislado	Si
47	2011	DENV-1	22,84	9	Central	Ñemby	2/5/2011	Aislado	Si
72	2011	DENV-1	19,29	10,07	Central	San Lorenzo	3/3/2011	Aislado	Si
74	2011	DENV-1	21,55	9,39	Central	Mariano Roque Alonso	3/3/2011	Aislado	No
84	2011	DENV-1	23,79	8,71	Central	Mariano Roque Alonso	6/4/2011	Aislado	Si
88	2011	DENV-1	20,93	9,57	Central	Ñemby	6/4/2011	Aislado	Si
90	2011	DENV-1	19,58	9,98	Central	Fernando de la Mora	7/3/2011	Aislado	Si
93	2011	DENV-1	20,98	9,56	Central	Sin Datos	23/2/2011	Aislado	No
94	2011	DENV-1	21,35	9,45	Central	Mariano Roque Alonso	17/2/2011	Aislado	No
95	2011	DENV-1	21,26	9,47	Central	Asunción	17/2/2011	Aislado	Si
96	2011	DENV-1	21,43	9,42	Central	Sin Datos	8/3/2011	Aislado	No
4445	2016	DENV-1	19,98	9,01	Central	Itauguá	27/3/2016	Suero	No
4451	2016	DENV-1	25,16	7,71	Central	San Lorenzo	25/3/2016	Suero	No
4456	2016	DENV-1	28,02	6,99	Capital	Asunción	26/3/2016	Suero	Si
4457	2016	DENV-1	26,18	7,46	Capital	Asunción	26/3/2016	Suero	Si
4459	2016	DENV-1	26,09	7,48	Central	Ñemby	25/3/2016	Suero	No

Código del Estudio	Año	Tipo	Ct (DMTP)	Carga Viral (log₁₀ copias/mL)	Dpto.	Ciudad	Fecha de toma de muestra	Tipo de muestra	Secuenciadas
4460	2016	DENV-1	24,03	7,99	Central	Fernando de la Mora	23/3/2016	Suero	Si
4466	2016	DENV-1	25,58	7,61	Central	Guarambaré	23/3/2016	Suero	Si
4470	2016	DENV-1	26,51	7,37	Central	Ypacaraí	28/3/2016	Suero	Si
4472	2016	DENV-1	28,21	6,95	Central	Luque	29/3/2016	Suero	Si
4480	2016	DENV-1	28,22	6,94	Central	Asunción	28/3/2016	Suero	No
4484	2016	DENV-1	23,47	8,13	Central	Ñemby	22/3/2016	Suero	No
4489	2016	DENV-1	24,1	7,98	Central	Mariano Roque Alonso	25/3/2016	Suero	Si
4493	2016	DENV-1	27,26	7,18	Central	San Lorenzo	23/3/2016	Suero	No
4497	2016	DENV-1	22,34	8,42	Central	Asunción	28/3/2016	Suero	Si
4503	2016	DENV-1	22,77	8,31	Central	Luque	21/3/2016	Suero	Si
4504	2016	DENV-1	27,51	7,12	Central	Areguá	22/3/2016	Suero	Si
4508	2016	DENV-1	26,22	7,45	Central	Capiatá	22/3/2016	Suero	No
4512	2016	DENV-1	24,95	7,76	Central	Fernando de la Mora	22/3/2016	Suero	Si
4613	2016	DENV-1	26,2	7,45	Central	Fernando de la Mora	24/2/2016	Suero	No
4726	2016	DENV-1	24,16	7,96	Central	Capiatá	22/3/2016	Suero	Si
H5	2018	DENV-1	24,05	8,31	Central	Ñemby	12/1/2018	Suero	Si
H35	2018	DENV-1	22,17	8,83	Central	Villa Elisa	24/1/2018	Suero	Si
H88	2018	DENV-1	21,47	9,41	Central	Ñemby	1/3/2018	Suero	Si
H96	2018	DENV-1	21,75	9,32	Central	Villa Elisa	7/1/2018	Suero	Si
H101	2018	DENV-1	21,93	9,27	Central	Villa Elisa	16/1/2018	Suero	Si
H132	2018	DENV-1	24,16	8,6	Central	Villa Elisa	10/4/2018	Suero	Si
H143	2018	DENV-1	22,69	9,04	Central	Villa Elisa	17/4/2018	Suero	Si
H165	2018	DENV-1	22,64	9,06	Central	Villa Elisa	27/4/2018	Suero	Si
H171	2018	DENV-1	29,67	6,94	Central	Villa Elisa	7/5/2018	Suero	Si
I134	2018	DENV-1	26,41	7,92	Capital	Asunción	25/5/2018	Suero	Si
X3	2018	DENV-1	23,9	8,26	Central	Fernando de la Mora	7/2/2018	Suero	Si

Código del Estudio	Año	Tipo	Ct (DMTP)	Carga Viral (log₁₀ copias/mL)	Dpto.	Ciudad	Fecha de toma de muestra	Tipo de muestra	Secuenciadas
X8	2018	DENV-1	23,3	8,43	Central	Asunción	17/2/2018	Suero	Si
X12	2018	DENV-1	21,3	8,97	Central	Lambaré	24/2/2018	Suero	Si
X15	2018	DENV-1	19,49	9,46	Central	Itauguá	28/2/2018	Suero	Si
X23	2018	DENV-1	24,62	8,07	Capital	Asunción	8/3/2018	Suero	Si
X29	2018	DENV-1	27,79	7,2	Capital	Asunción	20/3/2018	Suero	Si
X37	2018	DENV-1	22,37	8,68	Central	Capiatá	27/3/2018	Suero	Si
X40	2018	DENV-1	19,62	9,43	Central	Ypacaraí	8/3/2018	Suero	Si
X45	2018	DENV-1	23,53	7,96	Central	Nueva Italia	6/6/2018	Suero	Si

Obs.: DMTP: Dengue multiplex (rRT-PCR para tipificación de DENV). Aislado: Virus aislado en cultivo celular (C6/36).