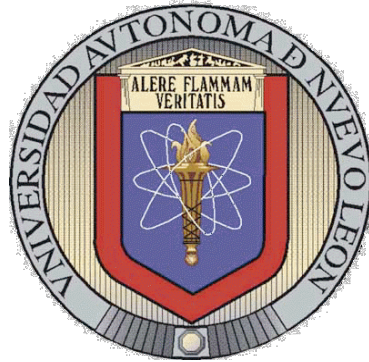


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL VIRUS
DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN EN LA DINÁMICA DE SU TRANSMISIÓN.

Por:


Q. B. P. SELENE MARYSOL GARCIA LUNA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con
orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Septiembre, 2011.

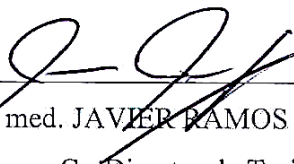
**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL
VIRUS DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN EN LA DINÁMICA DE SU
TRANSMISIÓN.**

Aprobación de la Tesis:



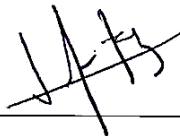
DRA. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

Director de Tesis



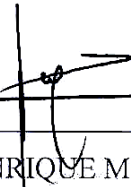
DR. med. JAVIER RAMOS JIMENEZ

Co-Director de Tesis



DR. C. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS

Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES



Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo recibido durante mis estudios de maestría con el número de becario 36485 (CVU 288357). Así como por la beca mixta otorgada para la estancia de investigación llevada a cabo, como parte del **Programa de becas-mixtas en el extranjero para becarios CONACYT nacionales 2011-2012**.



Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León (LESPNL)** por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo y cumplimiento de este trabajo.



A la **Dra. Shannon Bennett** de la Escuela de Medicina John A. Burns de la Universidad de Hawaii por su invaluable colaboración.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ana María Rivas Estilla por permitirme colaborar en este proyecto. Con el cual aprendí y me supere como profesionista y persona.

Dra. Shannon Bennett por ser un ejemplo a seguir como investigadora. Por considerarme parte de su familia y equipo de investigación, le agradezco su confianza y el haberme hecho conocer que la ciencia no tiene fronteras de una forma sencilla y humilde.

M.C.P. Desireé Leduc Galindo por haber formado un equipo de trabajo conmigo, porque el desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible sin tu trabajo y apoyo. Gracias por tu compañía a lo largo del trabajo experimental.

A mis compañeros de **generación 2009-2011**, por haberse convertido en una parte importante e inolvidable de mi vida, gracias. Especialmente: **Artemisa Luévano, Azalea Arreola, Gloria López, Sonia Lozano y Mario Simental** por su asesoría en el trabajo de laboratorio, por su compañía en las horas de trabajo, por su disponibilidad y consejos cuando hubo problemas, porque sin ustedes nada hubiera sido igual. En resumen, por su amistad incondicional durante este proceso.

A **Panpim Thongsripong, Estelle Martin, Argon Steel, Kelsey Roe y Donalyn Naihe** por su hospitalidad y amabilidad durante mi estancia de investigación. Gracias por compartir conmigo momentos inolvidables.

A mis compañeros del laboratorio de Infectología Molecular, a la **Dra. Clara Ríos** y el **MC. Angel Merino**, especialmente al **Q.B.P Willy Hernandez** y **TSU. Alejandro Enriquez** por su colaboración en este proyecto.

Dr. Abelardo Chávez y **Dra. Rocío Castro** por su apoyo y consejos durante esta etapa de mi formación profesional. Gracias por su amistad, espero conservarla siempre.

A mis amigas **Erika González, Laura Morales, Gaby Escobar, Leo López y Aracely Ramirez**, por su amistad, comprensión y cariño.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, especialmente a **Juany, Normita, Lupita y Ariadna**.

DEDICATORIA

A mi madre, gracias por tu apoyo y amor incondicional.

A mi hermano, por tus palabras de ánimo cuando fueron necesarias.

A mis abuelos, tíos, y primos, por su comprensión y cariño.

A mi novio, porque si escribiera todo por lo que eres especial para mi, no bastaría esta hoja. Un millón de gracias por: estar conmigo siempre, por tu paciencia y por tu amor.

A todos ustedes gracias por compartir conmigo esta etapa.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y en el laboratorio de la Dra. Shannon Bennett en John A. Burns School of Medicine, University of Hawai'i at Manoa. Contando con la colaboración del Banco de Sangre del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y del Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Nuevo León, SSA.

Bajo la dirección de la Dra. Ana Maria Rivas Estilla y la co-dirección del Dr. Javier Ramos Jimenez y el Dr. Ildefonso Fernandez Salas y la importante colaboración de la Dra. Shannon N. Bennett.

TABLA DE CONTENIDO

<i>INDICE DE FIGURAS</i>	viii
<i>INDICE DE TABLAS</i>	ix
<i>INDICE DE GRAFICAS</i>	x
<i>ABREVIATURAS</i>	xi
<i>RESUMEN</i>	xii
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ANTECEDENTES.....	2
1.- Los virus.....	2
1.2.- <i>Flavivirus</i>	3
2.- Perspectiva histórica de los virus del Dengue (DENV).....	8
3.- Epidemiología.....	12
4.- Transmisión.....	17
4.1.- Agente etiológico.....	17
4.2.- El vector.....	18
4.3.- El hospedero.....	19
5.- Clasificación de caso de Dengue/Manifestaciones clínicas.....	20
5.1.- Fiebre de Dengue (DC).....	20
5.2.- Fiebre hemorrágica de Dengue (DH).....	21
5.3.- Síndrome de shock por Dengue (SSD).....	22
6.- Pruebas diagnósticas para DENV.....	23
6.1.- Infección primaria.....	24
6.2.- Infección secundaria.....	24
6.3.- Pruebas serológicas (MAC-ELISA).....	25
6.3.1.- ELISA IgM (MAC-ELISA).....	25

6.3.2.- ELISA IgG.....	26
6.4.- Detección de antígenos.....	27
7.- Factores de riesgo.....	27
8.- Variabilidad genética del DENV.....	31
8.1.- Filogenia del DENV-1.....	36
8.2.- Filogenia del DENV-2.....	37
8.3.- Filogenia del DENV-3.....	38
8.4.- Filogenia del DENV-4.....	39
9.- Significancia en epidemiología molecular de la variabilidad genética de los virus del dengue	39
III.- JUSTIFICACION.....	44
IV.- OBJETIVOS.....	45
1.- Objetivo general.....	45
2.- Objetivos específicos.....	45
V.- AREA DE ESTUDIO.....	46
VI.- METODOLOGIA.....	48
1.- Pruebas moleculares.....	49
1.1.- Muestras biológicas.....	49
1.2.- Determinación del antígeno viral (NS1) por ELISA.....	49
1.3.- Serotipificación por qPCR.....	50
1.3.1.- Extracción de ARN.....	50
1.3.2.- Transcripción reversa del ARN viral y qRT-PCR múltiplex.....	51
1.4.- Transcripción reversa del ARN viral.....	52
1.5.- Amplificación reversa del ARN viral.....	54

1.5.1.- Diseño de iniciadores u oligonucleótidos.....	54
1.5.2.- Amplificación de un segmento del DENV por PCR.....	54
1.6.- Secuenciación genómica del DENV.....	56
1.7.- Análisis de la secuencia.....	56
2.- Pruebas para el DENV.....	57
2.1.- Muestras biológicas.....	57
2.2.- Pruebas de ELISA.....	58
2.2.1.- Procedimiento de ELISA para la detección de IgG.....	58
2.2.2.- Procedimiento de ELISA para la detección de IgM.....	60
VII.- RESULTADOS.....	62
1.- Genomas virales.....	62
2.- Amplificación del gen de envoltura (E) del DENV.....	64
3.- Análisis filogenético.....	67
4.- Vigilancia serológica	71
VIII.- DISCUSION.....	74
IX.- CONCLUSIONES.....	84
X.- PERSPECTIVAS.....	85
XI.- ANEXOS.....	86
XII.- BIBLIOGRAFIA.....	89
Resumen autobiográfico	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Organización del genoma de los <i>Flavivirus</i>	5
Figura 2.- Ciclo de replicación de los <i>Flavivirus</i>	7
Figura 3.- Distribución de <i>A. aegypti</i> y áreas de transmisión de Dengue en Latinoamérica.....	11
Figura 4.- Promedio anual del número de casos de DC y DH reportados y países que reportaron dengue de 1955-2007.....	12
Figura 5.- Riesgo de transmisión de Dengue en México.....	13
Figura 6.- Casos de fiebre y fiebre hemorrágica por Dengue 2004-2010.....	14
Figura 7.- Incidencia y serotipos aislados de casos confirmados de dengue por entidad federativa. México 2010.....	15
Figura 8.- Casos de Dengue y serotipos confirmados en Nuevo León, México 2004-2010.....	16
Figura 9.- Estructura del genoma del Virus del Dengue.....	17
Figura 10.- <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 11.- <i>Aedes albopictus</i>	19
Figura 12.- Distribución global del Virus del Dengue.....	40
Figura 13.- Área de estudio.....	46
Figura 14.- Área metropolitana del estado de Nuevo León.....	47
Figura 15.- Esquema general de la metodología.....	48
Figura 16.- Amplificación del gen de envoltura del DENV.....	65
Figura 17.- Árbol filogenético mostrando contexto genotípico.....	69
Figura 18.- Árbol filogenético mostrando comparación con aislados de Latinoamérica.....	70
Figura 19.- Ubicación geográfica de los linajes encontrados en Nuevo León.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genotipos del Virus del Dengue.....	35
Tabla 2.- Oligonucleótidos y sondas para la retrotranscripción y qPCR múltiplex de un solo paso.....	51
Tabla 3.- Mezcla de reacción de RT-qPCR múltiplex.....	52
Tabla 4.- Programa de retrotranscripción y qPCR múltiplex para la serotipificación.....	52
Tabla 5.- Mezcla de reacción “A”.....	53
Tabla 6.- Mezcla de reacción “B”.....	53
Tabla 7.- Programa de temperaturas para la retrotranscripción.....	53
Tabla 8.- Primers para la amplificación y secuenciación del gen de envoltura del DENV.....	54
Tabla 9.- Mezcla de reacción PCR gen E.....	55
Tabla 10.- Programa de PCR para la amplificación del gen Env.....	55
Tabla 11.- Genomas virales obtenidos según serotipo y diagnóstico clínico.....	62
Tabla 12.- Datos clínicos y epidemiológicos de los aislados utilizados en este estudio.....	65
Tabla 13.- Secuencias de referencia del DENV-1 utilizadas para el análisis filogenético.....	68

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1.- Distribución mensual de los aislamientos de DENV en Nuevo León.....	62
Gráfica 2.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-1.....	63
Gráfica 3.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-2.....	63
Gráfica 4.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-4.....	64
Gráfica 5.- Vigilancia serológica del DENV en donadores de sangre.....	72
Gráfica 6.- Número de casos asintomáticos según municipio.....	73

ABREVIATURAS

ARN = Ácido ribonucleico

ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario

CENAVECE = Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades

DENV = Virus del dengue

DEN- = dengue tipo

DC = Fiebre de Dengue o Dengue clásico

DH = Fiebre hemorrágica de dengue o Dengue hemorrágico

E o Env = envoltura del Virus del Dengue

Fw = Forward

ML = maximum likelihood

nt = nucleotidos

PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa

qRT-PCR= Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

RT-PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Reversa

Rv = Reverse

SINAVE = Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SSD = Síndrome de shock por dengue

WHO o OMS = Organización Mundial de la Salud

°C = Grados Centígrados

μl = microlitros

ml = mililitros

l = litro

g = gramos

mg = miligramos

M = Molar

mM = milimolar

μM = micromolar

RESUMEN

Presenta: Q.B.P. Selene Marysol García Luna.

Fecha de graduación: Octubre 2010

**Universidad Autónoma de Nuevo León.
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.
Facultad de Medicina.**

Título del Estudio: Identificación y análisis de las variantes genéticas del Virus del Dengue y su asociación en la dinámica de su transmisión.

Número de páginas: 102

Introducción.- El dengue es la principal enfermedad arboviral transmitida por vector, la cual es ocasionada por cualquiera de los cuatro serotipos del Virus del Dengue (DENV-1-4). La OMS estima que 2.5 billones de personas se encuentran en riesgo por esta infección y que 50 millones de casos ocurren anualmente a nivel mundial.

En México, durante el 2010 se reportó la circulación de los cuatro serotipos de este virus, específicamente en Nuevo León, la Secretaría de Salud reportó 2272 casos de Dengue de los cuales la mayoría se debieron a infecciones por el DENV-1. Aunque existen reportes de la vigilancia epidemiológica en el país, el reporte de los genotipos virales es limitado.

Objetivo.- Identificar y analizar las variantes genéticas de los virus del dengue circulantes, así como su asociación en la dinámica de la transmisión de estos en el estado de Nuevo León, México.

Material y Métodos.- Se empleó método de Máxima Probabilidad (ML) así como un valor de soporte de 100 replicaciones para la realización del análisis filogenético de genomas virales del DENV-1 aislados durante el brote epidémico de dengue que tuvo lugar en Nuevo León durante el 2010. Además se evaluó la presencia de anticuerpos anti-DENV mediante ELISA comercial para la determinación de IgM e IgG (PanBio Dengue IgG-capture ELISA, PanBio Dengue IgM-capture ELISA) en donadores de sangre.

Resultados.- Se estimó la relación filogenética de 36 genomas del DENV-1 (2010) encontrando que estos pertenecen al genotipo V América-África. Además se identificó que estas se agruparon 3 linajes diferentes que co-circularon durante el 2010. Por otro lado, se identificó un 3% de prevalencia de infecciones asintomáticas de DENV (vigilancia serológica) en 943 sujetos sanos habitantes de Nuevo León. De estas el 1.2% correspondió a infecciones primarias activas (IgM anti-DENV) y el 1.8% a infecciones secundarias activas (IgG anti-DENV).

Conclusión.- Se logró la identificación de las variantes genéticas del DENV-1 circulantes en Nuevo León durante el 2010. Además se determinó un 3% de prevalencia de anticuerpos anti-DENV en donadores asintomáticos.

Dra. Ana Maria Guadalupe Rivas Estilla
Director de Tesis

I.- INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades emergentes que amenazan la salud pública mundial son transmitidas por vectores artrópodos y constituyen un problema global cuyo impacto social y económico es enorme [1, 2].

Entre los principales vectores de enfermedades se encuentran los mosquitos los cuales son capaces de transmitir: malaria, fiebre amarilla, dengue, encefalitis, filariasis y fiebre del oeste del Nilo [2-4].

Con respecto a lo anterior, el dengue es una enfermedad ocasionada por la infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1-4) los cuales son transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos del género *Aedes*.

Ha sido señalado que el aumento en los casos de dengue puede atribuirse a tres factores principalmente, siendo el primero el incremento en la urbanización y en la densidad poblacional, lo que conduce a un aumento de sitios criaderos del vector y a un mayor contacto entre el vector y el huésped; en segundo lugar, la invasión global de los principales vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* lo que conduce a un incremento en la distribución geográfica y la co-circulación de los cuatro serotipos del virus; finalmente, la interacción y evolución de los cuatro serotipos, resulta en un incremento en la severidad [5-9]. Por lo anterior, el dengue se considera como la enfermedad viral transmitida por mosquitos de más rápida distribución en el mundo, lo que aunado con su severidad la ha llevado a convertirse en la infección arboviral más común en regiones tropicales y subtropicales del mundo [7, 10-12].

La Organización Mundial de la Salud estima que anualmente ocurren 50 millones de infecciones y que aproximadamente 2.5 billones de personas que viven en zonas endémicas se encuentran en riesgo de contraer la infección cada año [10].

II.- ANTECEDENTES

1.- Los virus

Los virus como patógenos causantes de enfermedades en el hombre se pueden encontrar en muchas páginas de la historia de la humanidad ya que han sido causales de un gran número de epidemias a lo largo de la historia universal.

Hasta fines del siglo XIX se conocía la etiología de muchas enfermedades infecciosas, sin embargo para un gran número de enfermedades no solo del hombre sino de plantas y animales permanecía sin identificarse el agente causal, siendo hasta el siglo XX que se descubrieron a los virus como causantes de enfermedades infecciosas.

Las primeras características diferenciales de los virus con respecto a otros agentes infecciosos fueron: el tamaño, estimado por su capacidad de atravesar filtros que retienen a las bacterias y la incapacidad para reproducirse en medios biológicos inertes, requiriendo para su propagación de animales o cultivos celulares, características que actualmente no son exclusivas de estos agentes.

Según su definición los virus son parásitos intracelulares obligados de tamaño submicroscópico. Sin embargo, para contar con una definición adecuada es necesario adicionar algunas cláusulas adicionales como que las partículas virales son producidas a partir de componentes ensamblados o preformados, no crecen o se someten a división, esto en comparación con otros agentes que crecen por un incremento de la suma integrada de sus componentes y se reproducen por división.

Además, los virus carecen de información genética que codifica para el aparato necesario para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas por lo que depende absolutamente de la célula huésped para su funcionamiento [13].

1.2.- *Flavivirus*

De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los *Flavivirus* (del latín flavi ‘amarillo’), comprenden uno de los tres géneros que componen la familia viral *Flaviviridae* la cual comprende alrededor de 70 virus envueltos cuyo genoma esta constituido por ARN de polaridad positiva, los otros dos son los géneros *Pestivirus* (del latín pestis ‘plaga’) y *Hepacivirus* (del griego hepar, hepato ‘hígado’), aunque estos últimos poseen estrategias de replicación similares a las de los *flavivirus*, estos grupos son antigénicamente distintos, no son transmitidos por artrópodos y representan linajes que divergieron tempranamente en la evolución de esta familia viral [14]. Por otro lado, se sabe con certeza a través de la evidencia geográfica que el progenitor de las aproximadamente 80 especies que constituyen el género *Flavivirus* surgió en África [15].

Con el curso de la especiación, los *flavivirus* han mostrado una diversificación substancialmente ecológica, lo cual se puede evidenciar con las diversas formas de transmisión de los diferentes linajes de los *flavivirus*, ya que estudios filogenéticos del género sugieren que el ancestro pudo haber sido un virus de mosquitos solamente el cual, posteriormente adquirió la habilidad de infectar vertebrados, los demás *flavivirus* se dividen en virus transmitidos a vertebrados mediante vector, cuyos mayores grupos emplean garrapatas y mosquitos para su transmisión horizontal, y otro grupo el cual infecta vertebrados sin el uso de artrópodos vectores. Lo anterior no sugiere si los transmitidos por vector o sin vector fueron ancestrales pero la posición de los virus que infectan solamente mosquitos sugiere que la transmisión a través de mosquitos a los vertebrados precedió a la pérdida de la transmisión por vector. La transmisión a través de garrapatas pudo haber evolucionado del linaje transmitido por mosquitos después de que el linaje que infecta solo vertebrados surgió [15].

A la fecha todos los *flavivirus* conocidos como patógenos de humanos son transmitidos por vectores, y con la excepción de los virus del Dengue (DENV-1-4) todas son

zoonosis. Destacando que las que representan amenazas significativas para la salud humana incluyen las ocasionadas por los virus de la Fiebre Amarilla, del Oeste del Nilo, del Dengue, de la Encefalitis Japonesa, y el de la Encefalitis por garrapata [4].

Los virus que pertenecen al género *Flavivirus* se caracterizan por poseer una estructura esférica, un tamaño de entre 40-50 nm, los cuales están cubiertos por una envoltura lipídica. Otra de las características de los *flavivirus* es que estos tienen un grupo común de epítopes en la proteína de envoltura que resulta en extensivas reacciones cruzadas en las pruebas serológicas lo que hace difícil el diagnóstico serológico inequívoco de los *flavivirus* [9].

La organización del genoma de los *Flavivirus* está conservado a través del género (figura 1), siendo este, monocatenario de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11,000 bases de longitud, con un cap tipo I ($m^7GpppAmpN_2$) en el extremo 5', cuenta además con un solo marco de lectura abierto flanqueado por regiones no codificantes (UTR) en sus extremos 5' y 3', las cuales forman estructuras secundarias conservadas en forma de tallo-bucle las cuales son necesarias para la replicación y traducción del genoma viral, el único marco de lectura abierto codifica para una única poliproteína, la cual es procesada co- y postraduccionalmente para generar tres proteínas estructurales (cápside-premembrana/membrana-envoltura; C-pRM/M-E) y siete no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) [9, 16-20].

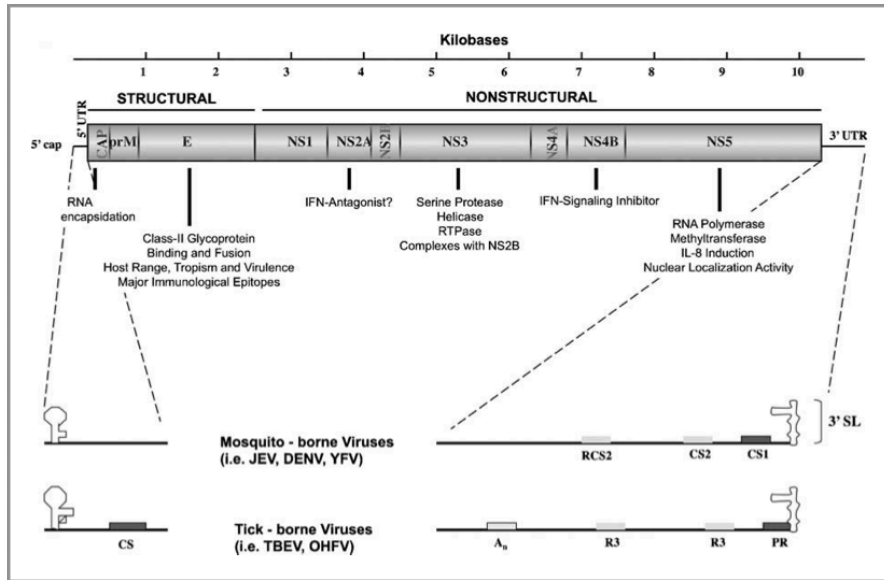


Figura 1.- Organización del genoma de los *Flavivirus* [17].

De las proteínas estructurales, la glicoproteína de envoltura es esencial para la entrada viral a la célula ya que contiene el sitio de unión para el aún no identificado receptor celular, dentro del endosoma la proteína de envoltura (E o Env) cambia de homodímero a homotrímero lo que permite la fusión con la membrana celular [16].

Específicamente para el Virus del Dengue, se han propuesto diferentes receptores de células de mamíferos, incluyendo el heparán sulfato, las proteínas de shock térmico 70 (HSP 70) y HSP90, GRP78/Bip, CD14 y el receptor de laminina de alta afinidad 37 kDa/67-KDa, así como la molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas (ICAM-3) -no integrina (DC-SIGN) y la ICAM-3 no integrina específica de hígado/nódulo linfático [4].

Existen reportes donde en infecciones primarias por Virus del Dengue (DENV), el virus entra a las células blanco (según consenso son las células del linaje fagocítico mononuclear: monocitos, macrófagos y células dendríticas) después de que la proteína E se adhiere a los receptores de superficie, como el ICAM 3 no integrina específica de

células dendríticas (del inglés Dendritic Cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin) [4, 18].

Además los heparán sulfatos de superficie celular también están involucrados en la unión del virus del dengue a la superficie de células de mamíferos. Los heparán sulfatos son disacáridos repetidos de ácidos urónicos y L-idurónicos (derivados de glucosamina), y son variablemente o-glicosilados. Debido a estos esfuerzos, la unión y entrada viral a la célula sigue siendo deficiente. Co-receptores para la entrada del virus en las células dendríticas han sido identificados y analizados. Uno de los receptores es una lectina tipo C, CD209/DC-SIGN, y se cree que se unen a la proteína viral E, ayudando en la entrada a las células dendríticas. Otro hallazgo identificó al receptor de manosa presente en macrófagos presentando evidencia que los macrófagos dérmicos sirven como primera respuesta inmune celular innata, con la capacidad de proteger contra el virus del dengue después de la picadura del mosquito. Además, la familia de lectina tipo C dominio 5A (CLEC5A) puede servir como un receptor de reconocimiento de patrones para los macrófagos que interactúan con los virus del dengue para estimular la pro-liberación de citocinas inflamatorias [16].

Por su parte, las proteínas estructurales de los *Flavivirus* también han sido estudiadas reconociendo a la proteína NS5 como la ARN polimerasa dependiente de ARN, además posee una secuencia de localización nuclear así como actividad metiltransferasa, mientras que las proteínas NS2B y NS3 juntas actúan como proteasa viral. Sin embargo, la función de la mayoría de las proteínas no estructurales se desconoce [4, 15].

El ciclo de replicación de los *Flavivirus* es muy similar (figura 2). La infección con uno de los *flavivirus* transmitidos por artrópodos comienza cuando el vector toma sangre y el virus es introducido al hospedero, posteriormente el virus se une y entra a células permisivas vía endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizado, la acidificación del endosoma permite la fusión de membranas virales y celulares lo que permite la

entrada de la nucleocápside al citoplasma donde se lleva a cabo el desnudamiento del genoma. Luego, la traducción de la cadena de ARN toma lugar. Posteriormente, el virus cambia de traducción a la síntesis de un intermediario de cadena negativa, la cual sirve como templado para la producción de múltiples copias de ARN viral de cadena positiva. Las sucesivas rondas de traducción producen altos niveles de proteínas virales; las proteínas estructurales de la cápside (C), premembrana (prM) y de envoltura (E) son ensambladas con el ARN viral para generar viriones, los cuales son transportados a través del aparato de Golgi y secretados [4].

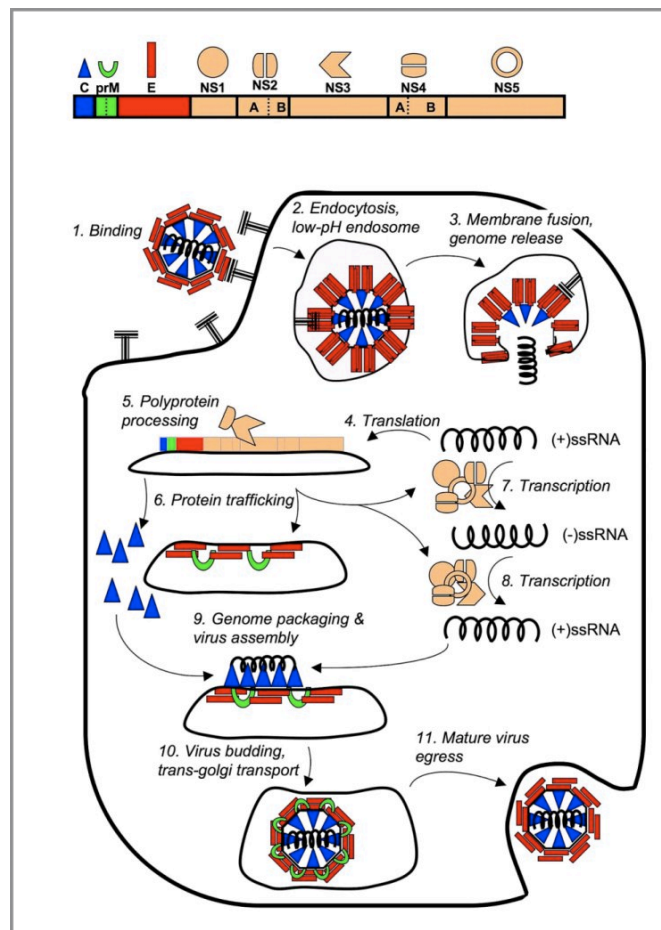


Figura 2.- Ciclo de replicación de los *Flavivirus*.

2.- Perspectiva histórica del Virus del Dengue (DENV)

La fiebre del dengue es posiblemente tan antigua como la humanidad, el registro más antiguo encontrado hasta la fecha de la enfermedad por dengue se encuentra en una enciclopedia china de síntomas y remedios de enfermedades, la cual fue publicada por primera vez durante la dinastía Chin (265 a 420 d.C.) y editado oficialmente en el 610 d.C. (dinastía Tang), y nuevamente en 992 d.C. (dinastía Sung del Norte). La enfermedad fue nombrada por los chinos como envenenamiento del agua y se pensaba que de alguna manera estaba relacionada con los insectos voladores asociados al agua [9].

Aproximadamente dos mil años después, los primeros brotes de una enfermedad compatible con la fiebre de dengue clásico tomo lugar en el Caribe en 1635 y 1699, mucho antes de que se reportaran las epidemias de 1779 y 1780 que se produjeron simultáneamente en Asia, África y Norte América. Estos acontecimientos describieron por primera vez evidencia de la amplia distribución geográfica de esta (o al menos de una enfermedad muy similar al dengue), alcanzando proporciones pandémicas para 1788. Siendo en 1789 cuando Benjamin Rush reportó el primer caso de la enfermedad y acuñó el término de ‘fiebre quebrantahuesos’[8]. Los registros históricos también indican una segunda serie de pandemias de dengue o enfermedades similares a dengue que cruzaron el mundo de África a India a Oceanía y a América, de 1823 a 1916, con una duración de 3 a 7 años [17]. Interesantemente, esta amplia distribución geográfica del dengue coincidió con el aumento en el comercio global ayudado por los barcos de vela.

Desde entonces, grandes brotes se han reconocido mundialmente cada 20-40 años. La ausencia de dengue epidémico de 1946 a 1963 puede ser atribuido al éxito parcial de los programas de erradicación de *Aedes aegypti* diseñados para la prevención de la fiebre amarilla [5, 8, 18, 21].

La segunda guerra mundial causó cambios ecológicos y demográficos significativos, hipotetizándose que el movimiento de tropas y civiles, el aumento en el número de individuos susceptibles en áreas endémicas, la destrucción del ambiente, el transporte de carga, la expansión económica, la continua urbanización y los asentamientos humanos que se llevaron a cabo durante dicho periodo contribuyeron y facilitaron la distribución de los virus y hasta cierto punto, de sus mosquitos vectores a través del sureste asiático y el pacífico occidental [8, 21].

La etiología viral del dengue fue sugerida experimentalmente hace un siglo, pero no fue hasta la segunda guerra mundial que los avances tecnológicos permitieron a investigadores japoneses y americanos el aislamiento del virus.

La identificación de los serotipos 1 y 2 se realizó al mismo tiempo (1944) seguido por la identificación de los serotipos 3 y 4 (1957) cuando emergió el dengue hemorrágico/síndrome de shock por dengue en las Filipinas y Tailandia en 1954, todos en humanos [21]. Posteriormente, se han logrado aislar los cuatro serotipos en mosquitos de la familia *Culicidae* y en el caso del DENV-2, también en otros primates [21, 22].

En el siglo pasado ocurrieron grandes epidemias, coincidiendo con la intensificación del transporte comercial entre los puertos de la región del Caribe y el Sur de los Estados Unidos con el resto del mundo. Mientras que en el siglo 20 la primera epidemia de Dengue Clásico en América, comprobada por laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela en 1963-64 asociándose al serotipo DENV-3 .

En 1953-54 en Trinidad se aisló por primera vez el agente causal de tipo 2 a partir de casos no epidémicos. En 1977 el serotipo DENV-1 fue introducido en América por Jamaica el que se diseminó por la mayoría de las islas del Caribe causando epidemias [23].

El serotipo 4 fue introducido en 1981 y desde entonces los tipos 1, 2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países donde el vector *Aedes aegypti* está presente [10].

En el Caribe co-circulan actualmente varios serotipos de Dengue, incluyendo el DENV-3, introducido en 1994 en Nicaragua, el cual constituye un riesgo importante para la población americana, extensamente susceptible a esta variante [24].

La primera epidemia de fiebre hemorrágica por dengue (DH) ocurrió en Manila, Filipinas en 1953-1954, siendo durante un periodo de 20 años que la enfermedad en forma epidémica se distribuyó a través del sureste asiático, para mediados de los 70's, el DH se convirtió en la principal causa de hospitalización y muerte en niños en la región [9].

La epidemia de Fiebre Hemorrágica de Dengue asociada al serotipo DENV-2, que afectó a Cuba en 1981, fue la primera ocurrida fuera de las regiones del sureste asiático y el pacífico occidental [25]. Este hecho ha sido considerado el evento más importante en la historia del Dengue en América. Dicha epidemia fue precedida por otra en el año 1977, con casos clínicos de presentación clásica ocasionados por el serotipo 1, que permaneció endémicamente por 4 años.

A pesar de que el virus del dengue se aisló por primera vez en las Américas en 1942, se sabe que ocasionó grandes brotes en el Caribe desde la primera mitad del siglo XVII, así como epidemias continentales o verdaderas pandemias a lo largo de los siglos XIX y XX. En América los primeros relatos históricos sobre el dengue mencionan la isla de Java en 1779 y Filadelfia (E.U.A.) en 1780, como los primeros lugares donde se reconocieron brotes de la enfermedad.

La primera gran epidemia de dengue hemorrágico (DH) en la región ocurrió en Cuba en 1981, con 24.000 casos de DH, 10.000 casos de síndrome de shock por dengue (SSD) y 158 muertes reportadas en un período de tres meses. En 1986 y 1987 se registraron brotes masivos de dengue clásico (DC) en Brasil. Investigaciones serológicas posteriores en el mismo país calculan 4 millones de casos de DC, la cifra clínicamente estimada es de 1 millón. En 1988 un brote de DC se registró a 1,700 metros sobre el nivel del mar en el estado de Guerrero, México. En 1990 casi un cuarto de los 300,000 habitantes de Iquitos, Perú, contrajo DC y en el mismo año se registraron 3,108 casos de DH con 78 muertes en Venezuela. Las últimas cifras disponibles para la región, que corresponden al año 2001, indican la ocurrencia de 482,799 casos de infección, de los cuales 9,893 fueron de DH/SD, con 161 muertes [6]. Varios países latinoamericanos han registrado la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus.

En América del Sur la enfermedad se ha extendido en Perú, Venezuela, Brasil y otros países (figura 3).

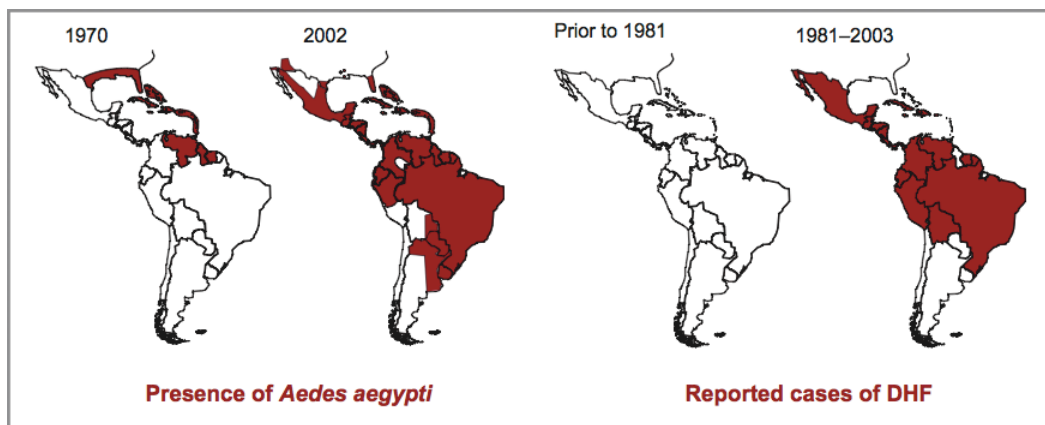


Figura 3.- Distribución de *A. aegypti* y áreas de transmisión de Dengue en Latinoamérica [21].

En México como en otras partes del mundo, la presencia del Dengue está condicionada a la existencia del vector (figura 3), siendo los estados con mayor riesgo en los últimos años: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima,

Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo [26].

México empezó a comunicar casos de dengue clásico a partir de 1978, mientras que a partir de 1984 se registraron casos de dengue hemorrágico en el país [26].

3.- Epidemiología

El dengue es la enfermedad transmitida por mosquitos de más rápida distribución en el mundo, estimando que en los últimos 50 años, la incidencia de esta se ha incrementado 30 veces con una expansión geográfica a nuevos países [10].

Además, se considera que el Virus del Dengue ocasiona la infección arboviral más común en los seres humanos, siendo responsable de alrededor de 50 millones de casos de fiebre del dengue anualmente (figura 4) incluyendo más de 500,000 casos de dengue hemorrágico/síndrome de shock a través del mundo tropical y subtropical [21, 27].

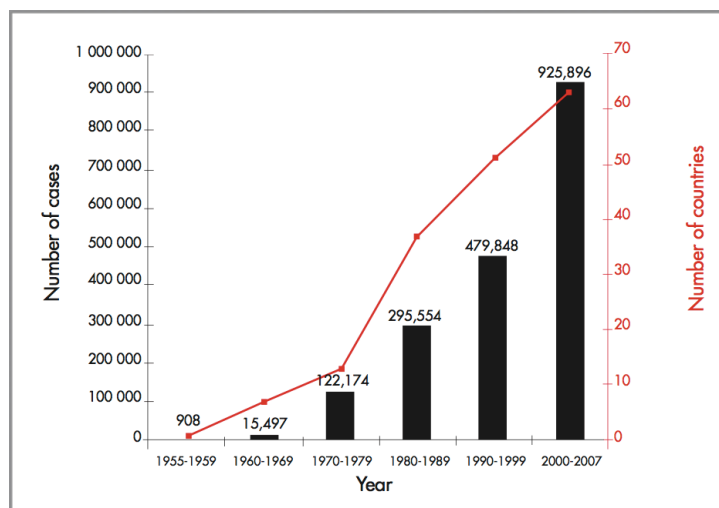


Figura 4.- Promedio anual del número de casos de DC y DH reportados y países que reportaron dengue de 1955-2007 [10].

En la actualidad, el virus del dengue representa un grave problema de salud mundial, ya que se estima que 3,500 millones de personas, lo que representa la mitad de la población

mundial se encuentra en riesgo de la infección con este virus en países tropicales y subtropicales.

En México como en otras partes del mundo, la presencia del Dengue está condicionada a la existencia del vector, siendo los estados con mayor riesgo: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (figura 5) [26].

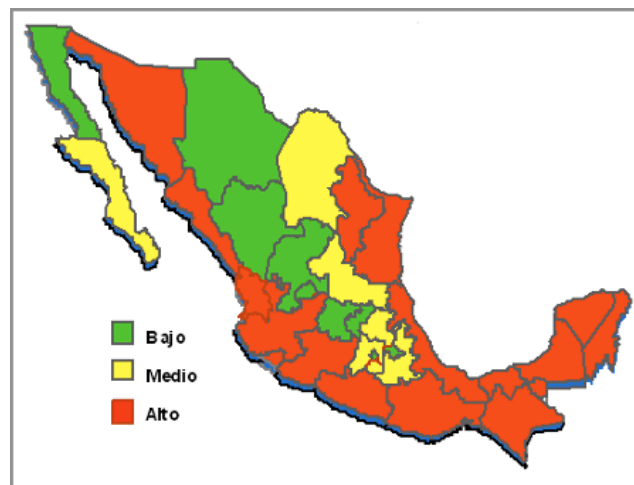


Figura 5.- Riesgo de transmisión de Dengue en México [26].

México empezó a comunicar casos de dengue clásico a partir de 1978, desde entonces y hasta el 2007, se ha observado un comportamiento cíclico en la aparición de brotes hasta de 50,000 casos, seguidos por años en los que el número de casos disminuye [28]. Mientras que a partir de 1984 se registraron casos de dengue hemorrágico en el país, siendo Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Colima y Guerrero los estados más afectados.

El Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) reportó el seguimiento de los movimientos del virus del dengue en México de 1994 al 2002, justificando la importancia de dicho monitoreo con base en que la presencia de los diversos serotipos del Dengue en el país constituyen un factor de riesgo para padecer la enfermedad. En cuanto al DENV-1 desde 1994 no se detectaba

asociado a brotes, siendo en 2002 cuando se detecta en Centroamérica y reaparece en Yucatán. El DENV-2 se reportó en 1999 en Chiapas, en 2000 en Veracruz y Oaxaca, en 2001 en Guerrero y península de Yucatán y para el 2002 en el pacífico occidental y en México, Tamaulipas, Hidalgo y Coahuila. El serotipo 3 para 1999 casi desaparece y en el 2002 este reaparece en brotes en varios estados. Mientras que el DENV-4 esta reportado en brotes durante 1995-1997 y 1999 [22, 26].

Recientemente, la Comisión Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó para el cierre del año 2009 un total de 55,961 casos de dengue, los cuales correspondieron a 44,565 casos de fiebre del dengue y 11,396 de dengue hemorrágico reportándose por este último un total de 96 defunciones [29].

Mientras que hasta la semana 52 del año 2010 se reportaron un total de 28,688 casos de los cuales 22,352 corresponden a la forma clásica de la enfermedad y 6336 de la variante hemorrágica la cual ocasiono un total de 47 defunciones (figura 6) [29].

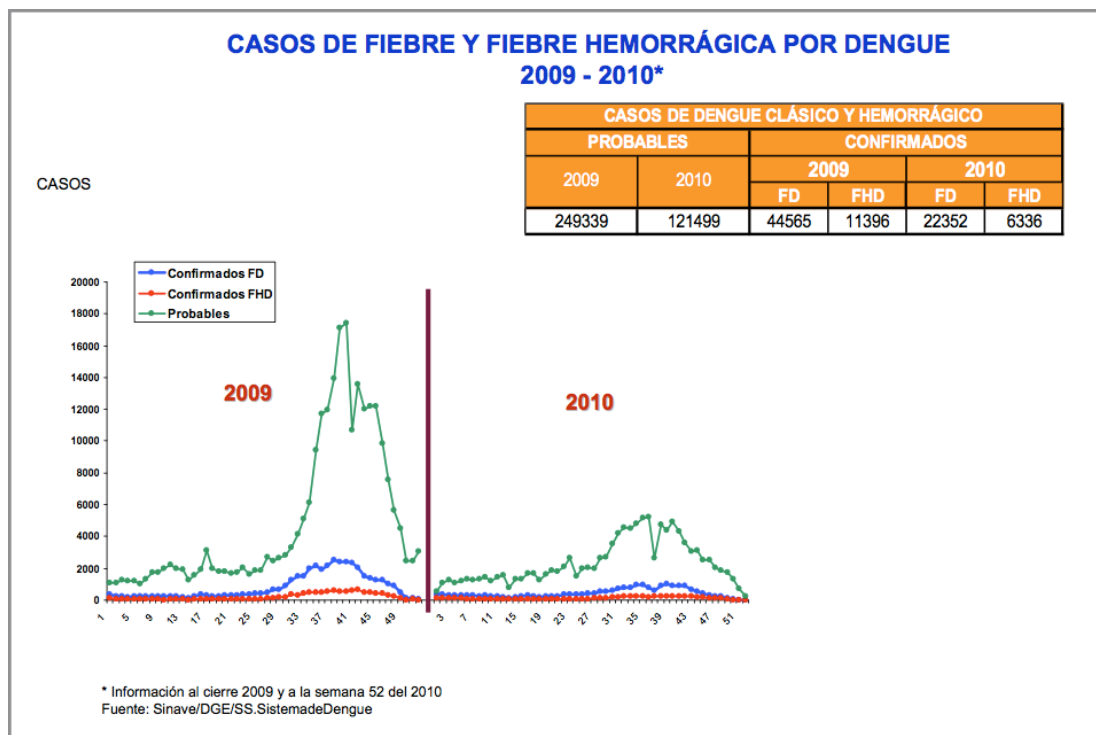


Figura 6.- Casos de fiebre y fiebre hemorrágica por dengue 2009-2010 [29].

En la figura 7, se describe la incidencia y serotipos aislados de casos confirmados de dengue por entidad federativa, donde hasta la semana 52 del 2010 se observa la presencia de los cuatro serotipos del virus en el territorio nacional así como que la incidencia mas alta se encuentra en el estado de Baja California Sur [29].

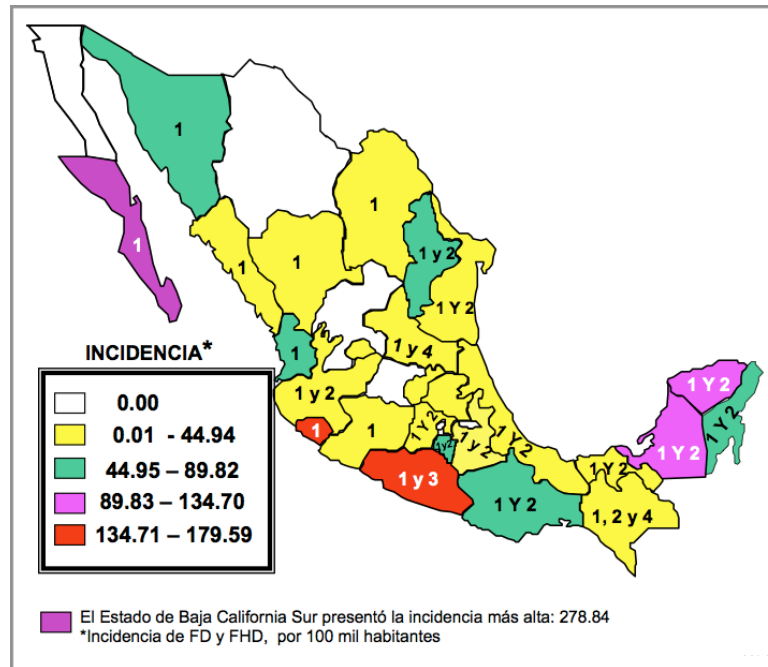


Figura 7.- Incidencia y serotipos aislados de casos confirmados de dengue por entidad federativa. México 2010 [29].

Específicamente para el estado de Nuevo León, de acuerdo al número de casos confirmados reportados en los panoramas epidemiológicos de dengue del 2004 al 2010 (figura 8), observando que hubo pocos casos en 2004 y 2006 sin embargo en 2005 se presentaron 781 casos totales de los cuales 327 correspondieron a dengue hemorrágico, otra cosa importante es que en este año se aislaron los serotipos 1, 2 y 3 del virus, además se observó que el número de casos totales reportados en 2007 fueron 3164 con 821 casos de dengue hemorrágico, posteriormente este número disminuye a ~850 y ~530 casos en 2008 y 2009 respectivamente, presentándose un incremento en el número de casos en 2010 con ~2200 casos de los cuales 172 fueron hemorrágicos registrándose una defunción (tasa de letalidad de 0.58). Cabe mencionar que se identificaron a los serotipos 1 (mayoritariamente) y 2 del virus [29-34].

Casos de Dengue y serotipos confirmados en Nuevo León, México 2007-2010.

	Casos FD	Casos FHD	Total de casos	Defunciones	Serotipos			
					1	2	3	4
2004*	36	3	39	0				
2005*	454	327	781	2	1	28	9	
2006*	86	21	107	2				
2007*	2343	821	3164	1	43			
2008*	803	54	857	0	52	2		
2009*	474	57	531	0	21	2		
2010*	2054	172	2226	1	76	2		

*Información correspondiente hasta la semana 52

**Casos confirmados de Dengue en Nuevo León, México.
2004-2010**

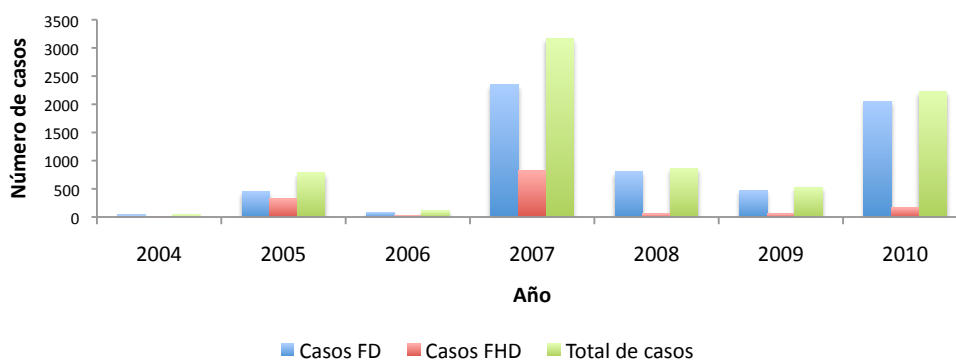


Figura 8.- Casos de Dengue y serotipos confirmados en Nuevo León, México 2004-2010 [29-34].

Desafortunadamente, la escasa información virológica disponible limita el panorama sobre lo que sucede fuera de los brotes, o bien lo ocurrido en años anteriores. Para ello se necesitan estudios sobre el estado de la memoria inmunológica en las diferentes regiones del país, incluidos no solo los casos sintomáticos.

4.- Transmisión

4.1.- Agente etiológico

La partícula madura del virus del dengue es esférica con un diámetro de 50 nm que contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, la membrana derivada del huésped y una sola copia del genoma de ARN de cadena sencilla y sentido positivo [10].

El genoma del virus consta de 10,703 nucleótidos, los cuales se traducen para generar una poliproteína precursora (figura 9) la cual es co- y pos-traduccionalmente procesada por proteasas virales y celulares para producir las proteínas virales que son tres proteínas estructurales (cápside C, el precursor de membrana prM que dará origen a la proteína M, la proteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS) [4].

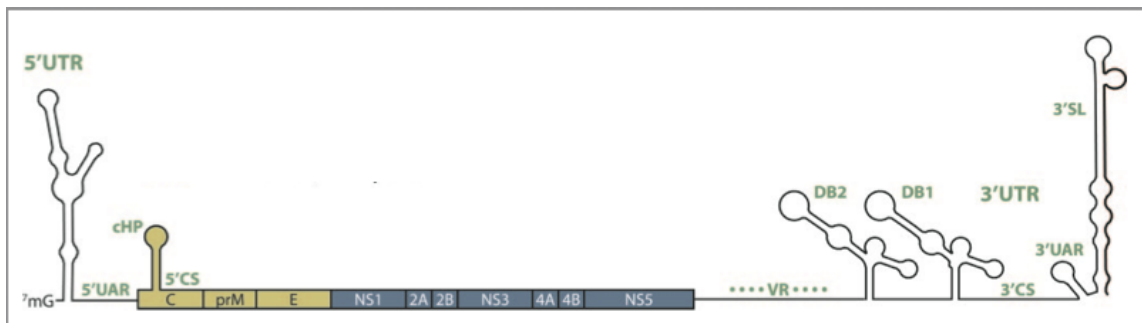


Figura 9.- Estructura del genoma del Virus del Dengue [4].

El Virus del dengue se clasifica en cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) los cuales difieren en aproximadamente el 30% de los nucleótidos a través de su genoma [27]. Debido a lo anterior, distintos genotipos o linajes (virus altamente relacionados en su secuencia nucleotídica) se han identificado dentro de cada serotipo, lo que resalta la extensa variabilidad genética de los serotipos del dengue. Sin embargo, los virus transmitidos por artrópodos (Arbovirus) han mostrado menores tasas de mutación comparados con virus que infectan directamente a humanos como la Influenza, HIV o Coronavirus, probablemente debido al efecto de compensación que se produce debido a

que el virus esta obligado a adaptarse alternativamente en el vector invertebrado y el hospedero vertebrado.

4.2.- El vector

El principal vector del virus del dengue es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual es una especie antropofílica de distribución cosmotropical que se presenta en todo el mundo dentro de los isotermas de 20 °C, la cual esta bien adaptada al ambiente urbano, pudiéndose encontrar afuera en la proximidad o adentro de las viviendas humanas. Su eficiencia como vector radica en que este deposita sus huevos en contenedores artificiales de agua limpia como neumáticos, latas, frascos, macetas entre otros, y que se alimenta por picadura de la sangre de humanos las cuales son por lo general durante la mañana o al atardecer [21, 35].

En cuanto a su descripción morfológica, *Aedes aegypti* (figura 10) es un mosquito de color negro con anillos blancos en las patas y una figura de color blanco plateado en forma de lira en la parte superior de su tórax, también posee bandas blancas en los tarsos posteriores y el abdomen [35].



Figura 10.- *Aedes aegypti*

Por otra parte el mosquito *Aedes albopictus* (figura 11) es el vector secundario del virus del dengue en el sureste de Asia, el pacifico occidental y crecientemente en

Centroamérica y Sudamérica [21]. Tiene una apariencia muy similar a la de *Aedes aegypti* con un cuerpo negro y marcas blancas en las patas, la diferencia principal entre los dos es que *A. albopictus* tiene una sola línea blanca-plateada en el centro del dorso del tórax [35].



Figura 11.- *Aedes albopictus*

4.3.- El hospedero

Los humanos son los principales hospederos amplificadores del virus. El virus circulante en la sangre de humanos virémicos es ingerido por mosquitos hembras durante su alimentación. El virus infecta el intestino medio del mosquito y subsecuentemente se distribuye sistemáticamente durante un periodo de 8-12 días. Después de este periodo de incubación extrínseca, el virus puede ser transmitido a otros humanos durante las siguientes alimentaciones. El periodo de incubación extrínseco está influenciado en parte por condiciones ambientales, especialmente la temperatura ambiente. A partir de entonces el mosquito permanece infectivo por el resto de su vida.

5.- Clasificación de caso de Dengue / Manifestaciones clínicas

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), el dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con una evolución clínica y desenlace impredecible. Mientras que la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico autolimitado y no severo, una pequeña proporción progresa a enfermedad severa, mayormente caracterizada por fuga plasmática con o sin hemorragia. La rehidratación intravenosa es la terapia de elección; esta, puede reducir la tasa de casos fatales de las formas severas a menos de 1%. La progresión de enfermedad no-severa a severa es difícil de definir, pero es un asunto importante ya que el tratamiento apropiado puede prevenir que estos pacientes desarrollen condiciones clínicas más severas [10].

En cuanto a las manifestaciones clínicas, la infección con cualquiera de los serotipos del virus puede ocasionar un amplio rango de enfermedades en humanos, entre las que se encuentran: infecciones asintomáticas, subclínicas, fiebre del dengue (dengue clásico) es una enfermedad febril debilitante y autolimitada que tiene entre sus manifestaciones clínicas: dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgia, artralgia y rash, la cual rara vez amenaza la vida, o las formas severas que son el dengue hemorrágico el cual se caracteriza por el incremento en la permeabilidad vascular (fuga de plasma), además de presentarse trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas y el síndrome de shock por dengue el cual ocurre cuando la fuga de fluidos a los espacios intersticiales resulta en shock hipovolémico el cual sin tratamiento apropiado puede conducir a la muerte para las cuales la tasa de casos fatales varía de 1 al 5% [21, 36, 37]. El periodo de incubación varía de 3 a 14 días (promedio 4-7 días). En áreas donde el dengue es endémico, la enfermedad es a menudo clínicamente inespecífica. [9, 38].

5.1.- Fiebre de Dengue (DC)

La fiebre de dengue o también conocida como dengue clásico se presenta principalmente en niños mayores de 15 años y adultos. Se caracteriza por la aparición repentina de

fiebre y una variedad de signos y síntomas no específicos incluyendo dolor de cabeza frontal, dolor retro-orbital, dolor corporal, náusea y vómito, dolor de articulaciones, debilidad y rash. La temperatura inicial puede incrementarse de 38 a 40 °C, la fiebre puede durar de 2 a 7 días. El dengue es generalmente autolimitado y raramente fatal. La fase aguda de la enfermedad dura de 3 a 7 días, pero la fase convaleciente puede prolongarse por semanas y puede estar asociado con debilidad y depresión especialmente en adultos. No se conocen secuelas permanentes asociadas con esta infección.

Los valores de laboratorio clínico asociadas con el DC incluyen neutropenia seguido de linfocitosis, a menudo marcada por linfocitos atípicos. Los niveles de enzimas del hígado, en el suero pueden elevarse; dicha elevación es usualmente moderada, aunque en algunos pacientes los niveles de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa alcanzan de 500 a 1000 U/litro. La trombocitopenia es también común en la fiebre del dengue, con conteo de plaquetas de menos de 100,000/ mm³[9].

5.2.- Fiebre hemorrágica de Dengue (DH)

La fiebre hemorrágica del dengue o Dengue hemorrágico se ha reportado como una enfermedad de niños por debajo de los 15 años, sin embargo, también puede ocurrir en adultos, se caracteriza por el repentino incremento de fiebre, la cual dura de 2 a 7 días, y una variedad de signos y síntomas no específicos [9, 39].

Durante la fase aguda de la enfermedad es difícil distinguir el dengue hemorrágico de la fiebre de dengue y otras enfermedades encontradas en áreas tropicales. Ya que no hay signos o síntomas específicos o característicos de DH durante la fase aguda, por otro lado, tan pronto la fiebre desaparece, manifestaciones características de fuga plasmática aparecen, haciendo el diagnóstico exacto posible en muchos casos. La prueba del torniquete, la cual indica que el paciente tiene un incremento en la fragilidad capilar, puede ayudar al médico para el diagnóstico [9].

El estadio crítico en DH es durante la defervescencia, pero los signos de falla circulatoria o manifestaciones hemorrágicas pueden ocurrir alrededor de 24 horas antes o después de que la temperatura llega a ser normal [9].

Las pruebas de laboratorio usualmente muestran que el paciente tiene trombocitopenia (conteo plaquetario de $100,000/\text{mm}^3$) y la hemoconcentración con respecto a la línea base tiene evidencia de síndrome de fuga vascular. Las manifestaciones hemorrágicas más comunes incluyen hemorragias en la piel como petequias, lesiones purpúricas, equimosis. La epistaxis, hemorragia gastrointestinal y hematuria se presentan menos frecuentemente [9, 40, 41].

5.3.- Síndrome de shock por dengue (SSD)

Comúnmente, el SSD es ocasionado por la fuga plasmática, la cual puede ser moderada y progresar a shock profundo con pulso y presión sanguínea indetectable. Por otro lado, los pacientes frecuentemente presentan dolor abdominal agudo justo antes del inicio del shock. En pacientes con DH severo o SSD, la fiebre así como signos y síntomas inespecíficos después de pocos días de duración son seguidos de la repentina deterioración de la condición del paciente. Durante o un poco antes de la disminución de la temperatura, la piel del paciente puede tornarse fría, manchas y congestionada; se observa frecuentemente cianosis y el pulso se vuelve rápido y débil.

Los pacientes en shock están en peligro de muerte a menos de que sean tratados apropiadamente [9]. La duración del shock es generalmente corto, ya que el paciente puede morir dentro de 8 a 24 horas, pero la recuperación también es usualmente rápida después de una terapia anti-shock, ya que aun los pacientes con pulso y presión sanguínea indetectable se recuperan generalmente en un periodo de 2-3 días [9].

Como en la fiebre del dengue, la leucopenia es común, mientras que la trombocitopenia y hemoconcentración son hallazgos constantes en DH y SSD. El conteo de plaquetas de $100,000/\text{mm}^3$ se presenta entre los días 3 y 8 de la enfermedad. La hemoconcentración, indicativa de fuga plasmática es siempre presente en DH pero es mas severa en pacientes

con shock. Mientras que la hepatomegalia es un hallazgo común pero no constante, mientras que niveles elevados de enzimas del hígado es común [9].

6.- Pruebas diagnósticas para DENV

El diagnóstico eficaz y preciso del dengue es de primordial importancia para la atención clínica del paciente es decir, la detección temprana de los casos más graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas, además de las actividades de vigilancia, control de brotes, la patogénesis, la investigación académica, el desarrollo de vacunas y ensayos clínicos. Debido a lo anterior una variedad de métodos de diagnóstico de laboratorio se han desarrollado para apoyar el manejo del paciente y control de la enfermedad. La elección del método de diagnóstico depende de la finalidad para la cual se realiza la prueba (por ejemplo, el diagnóstico clínico, estudio epidemiológico, el desarrollo, la vacuna), además del tipo de instalaciones de laboratorio, la experiencia técnica, los costos y el tiempo de toma de muestras [10].

Entre los métodos de diagnóstico de laboratorio para confirmar la infección por el virus del dengue se encuentran: la detección del virus, el ácido nucleico del virus, antígenos o anticuerpos, o una combinación de estas técnicas. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad requieren tecnologías más complejas y los conocimientos técnicos, mientras que las pruebas rápidas pueden comprometer la sensibilidad y especificidad para la facilidad de rendimiento y velocidad. El aislamiento del virus y la detección de ácidos nucleicos son más mano de obra intensiva y costosa, pero también son más específicas que la detección de anticuerpos por medio de métodos serológicos [10, 39].

Después de la aparición de la enfermedad, el virus puede ser detectado en el suero, el plasma, las células sanguíneas y otros tejidos durante 4-5 días. Durante las primeras

etapas de la enfermedad, el aislamiento del virus, el ácido nucleico o detección del antígeno se puede utilizar para diagnosticar la infección. Al final de la fase aguda de la infección, la serología es el método de elección para el diagnóstico. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos a la infección varía según el estado inmunológico del huésped.

6.1.- Infección primaria

Cuando la infección del dengue se presenta en personas que no han sido infectados con un *flavivirus* o inmunizados con una vacuna contra *flavivirus* (por ejemplo, la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas), los pacientes desarrollan una respuesta de anticuerpos primaria, la cual se caracteriza por un aumento lento de los anticuerpos específicos. Los anticuerpos del isotipo IgM son las inmunoglobulinas de primera vez [10]. Estos anticuerpos se detectan en el 50% de los pacientes por día 3-5 después de la aparición de la enfermedad, aumentando a 80% para el día 5 y el 99% a los 10 días. El pico de IgM se observa alrededor de dos semanas después de la aparición de los síntomas y luego los niveles se reducen en general a un nivel indetectable en 2-3 meses. Los anticuerpos anti-dengue IgG son generalmente detectables en títulos bajos al final de la primera semana de la enfermedad, aumentando poco a poco a partir de entonces, siendo detectables en el suero aun después de varios meses, y probablemente también durante toda la vida [10, 39].

6.2.- Infección secundaria

Durante una infección secundaria por dengue (la infección de un hospedero que ha sido infectado previamente por un virus del dengue, o, a veces después de la vacunación o infección por *flavivirus* diferentes al dengue), los títulos de anticuerpos aumentan rápidamente y reaccionan en términos generales en contra de muchos *flavivirus*. El isotipo de inmunoglobulina IgG generalmente se detecta en niveles altos, incluso en la fase aguda y persiste por períodos que duran de 10 meses o durante toda la vida [39].

Los niveles de IgM en la etapa convaleciente son significativamente más bajos en las infecciones secundarias que en las primarias y puede ser indetectable en algunos casos [10, 39].

6.3.- Pruebas serológicas (MAC-ELISA)

La prueba de MAC-ELISA tiene una buena sensibilidad y especificidad, pero sólo cuando se usa cinco o más días después de la aparición de fiebre. Diferentes estuches comerciales (ELISA o pruebas rápidas) están disponibles, pero tienen una sensibilidad y especificidad variable, se ha encontrado que las pruebas de ELISA en general proporcionan mejores resultados que las pruebas rápidas [39]. La reactividad cruzada con otros *flavivirus*, tales como la encefalitis japonesa, encefalitis de San Luis y la fiebre amarilla, no figuran como un problema, pero algunos falsos positivos se han obtenido en el suero de pacientes con infección por malaria, leptospirosis y dengue pasado. Estas limitaciones tienen que ser tomadas en cuenta cuando se utilizan las pruebas en las regiones donde estos patógenos co-circulan. Cabe mencionar que no es posible utilizar los ensayos de IgM para identificar los serotipos del dengue ya que estos anticuerpos poseen una amplia reactividad cruzada incluso después de las infecciones primarias [10].

6.3.1.- ELISA IgM (MAC-ELISA)

El IgM total en el suero de los pacientes es capturado por los anticuerpos anti-cadena μ específicos (específico para IgM humana), recubierta en una microplaca. Antígenos específicos de Dengue, de los cuatro serotipos (DEN-1, -2, -3 y -4), están vinculados a la captura de anticuerpos IgM anti-dengue y se detectan los anticuerpos monoclonales o policlonales directa o indirectamente, conjugado con una enzima que transforma un sustrato incoloro en productos de color, posteriormente la densidad óptica se mide por espectrofotometría.

Suero, sangre en papel filtro y la saliva, pero no orina, se pueden utilizar para la detección de IgM si las muestras se toman dentro del marco de tiempo apropiado (cinco días o más después de la aparición de la fiebre). Las muestras de suero se pueden probar en una sola dilución o diluciones múltiples. La mayoría de los antígenos utilizados para este ensayo se deriva de la proteína de envoltura del virus del dengue (generalmente infectadas por el virus sobrenadantes de cultivo celular o la succión preparaciones de cerebro de ratón) [10].

6.3.2.- ELISA IgG

El ELISA IgG se utiliza para la detección de infecciones recientes o pasadas de dengue (si sueros pareados se recogen en el plazo correcto). Este ensayo utiliza los mismos antígenos que el MAC-ELISA. El uso de ELISA de captura IgG específicos E/M (GAC) permite la detección de anticuerpos IgG por un período de 10 meses después de la infección. Los anticuerpos IgG son para toda la vida, medido por la ELISA IgG indirecta recubierta por antígeno E / M, pero un aumento al cuádruple o más de los anticuerpos IgG en sueros pareados de fase aguda y de convalecencia se puede utilizar para documentar casos de infección reciente. Un método de inhibición de ELISA (EIM) para detectar anticuerpos IgG del dengue también se utiliza para el diagnóstico serológico y vigilancia de casos de dengue, sistema que se basa en la competencia por los sitios de antígenos por anticuerpos IgG del dengue en la muestra y el conjugado IgG humana anti-dengue.

Este método puede ser usado para detectar anticuerpos IgG en suero o plasma y papel de filtro almacenadas muestras de sangre y permite la identificación de un caso como una infección primaria o secundaria por Dengue. En general, el ELISA IgG carece de especificidad dentro de los grupos del serocomplejo *flavivirus*. Después de infecciones virales, los anticuerpos producidos recientemente son menos ávidos que los anticuerpos producidos meses o años después de la infección. La avidéz de los anticuerpos se utiliza

en algunos laboratorios para discriminar las infecciones de primaria y secundaria, dichas pruebas no son de uso generalizado y no están disponibles comercialmente [10].

6.4.- Detección de antígenos

Hasta hace poco, la detección de antígenos de dengue en la fase aguda de suero fue poco frecuente en pacientes con infecciones secundarias ya que estos pacientes tenían antecedentes de inmunocomplejos de anticuerpos IgG. Nuevos desarrollos en ELISA y dot blot dirigidos a la envoltura / membrana (E / M) y el antígeno de la proteína no estructural 1 (NS1) demostraron que las altas concentraciones de estos antígenos en forma de complejos inmunes se pudo detectar en los pacientes con ambas infecciones de dengue primaria y secundaria hasta nueve días después de la aparición de la enfermedad. La glicoproteína NS1 es producida por todos los *flavivirus* y es secretada por las células de mamíferos, esta produce una respuesta humoral muy fuerte. Por lo que muchos estudios se han dirigido en el uso de la detección de NS1 para hacer un diagnóstico precoz de la infección por el virus del dengue [42]. Pruebas comerciales para la detección de antígeno NS1 ya están disponibles, aunque no diferencian entre los serotipos del dengue [43]. Su aplicación y utilidad están siendo evaluadas por los laboratorios de todo el mundo, incluyendo la red de la OMS / TDR / PDVI laboratorio [10].

7.- Factores de riesgo

En general, los factores relevantes de riesgo para la aparición de dengue en una región dada se encuentran incluidos dentro de los llamados macrodeterminantes, los cuales en Latinoamérica han sido definidos como:

Crecimiento poblacional: el porcentaje de población urbana y la expansión de las megaciudades (de 10 o más millones de habitantes) van en aumento. Se estima que para el año 2020 la población urbana en Latinoamérica estará cerca de 80% (para 1954 era de

sólo 54%), y para el año 2030 alrededor del 50% de la población vivirá en megaciudades. La incorporación de más tierras a la producción agrícola y el negativo impacto de la deforestación indiscriminada, en combinación con una tendencia de calentamiento global crea con frecuencia las condiciones para la aparición de enfermedades transmitidas por vector, como el dengue [6].

Urbanización inadecuada y no planificada: que está casi siempre acompañada por la falta o la disponibilidad insuficiente de agua potable, así como la disposición inapropiada de residuos líquidos y sólidos, pobres condiciones de vivienda y la presencia de abundantes vectores. En Latinoamérica este factor es de vital importancia debido al constante flujo migratorio de la provincia hacia las ciudades en búsqueda de mejores oportunidades de trabajo y condiciones de vida, supuestamente ofrecidas por estas áreas urbanizadas [6].

Migraciones: se ha calculado que alrededor de 500,000,000 personas cruzan las fronteras cada año a nivel mundial. Las razones de esta migración son tan variadas, y van desde el turismo (425,000,000), que generalmente supone un pequeño riesgo sanitario, a desplazamientos debidos a conflictos armados (30,000,000), a la inmigración legal o ilegal de trabajadores (aproximadamente 70,000,000), casi todas provenientes de países del tercer mundo). En las Américas, el verdadero impacto de la migración como un factor de la aparición de dengue, debe ser evaluado [6].

Vuelos aéreos: conjuntamente con las migraciones, el marcado aumento de los vuelos aéreos favorece la circulación del virus del dengue entre las áreas endémicas y las áreas libres de la enfermedad, debido a la llegada de personas durante el período de incubación de la enfermedad (el período de viremia puede prolongarse y el virus puede detectarse en la sangre dos días antes de la manifestación de los síntomas hasta ocho días después) y el riesgo posterior de infección de los mosquitos locales, con el desarrollo subsecuente de la epidemia [6, 21].

Calentamiento global: muchos científicos consideran que el calentamiento global perturba el delicado equilibrio ecológico, y por ende contribuye a nuevas epidemias de DC así como de malaria, fiebre amarilla, etc. Sin embargo, enfermedades contagiadas por vectores poseen una ecología extremadamente compleja y la información disponible no es conclusiva con respecto al papel potencial del calentamiento global en las enfermedades como el dengue. A pesar del innegable y potencialmente negativo impacto de los factores climáticos en la aparición y reaparición de enfermedades, el incremento de la transmisión del dengue en un área geográfica dada parece ser más bien multifactorial con las deficiencias de salud pública, y no con el clima como factor determinante. Esto se ilustra claramente a través del patrón de transmisión reciente de dengue en la frontera entre EUA y México. En 1995, el estado mexicano de Tamaulipas, registró 4,479 casos de dengue, 2,361 de ellos en Reynosa, una ciudad mexicana contigua a la ciudad de Hidalgo, en Texas, donde sólo 7 casos nativos se registraron. Mientras que estas dos ciudades comparten condiciones climáticas y ecológicas idénticas, y su población es en gran manera similar en origen, las condiciones sanitarias de vida y el ingreso de la población son notablemente diferentes [6].

Pobres condiciones sanitarias: Los principales factores que influyen directa o indirectamente en la magnitud de la transmisión del dengue parecen ser el bajo nivel socioeconómico y las pobres condiciones sanitarias de la población. Mientras que otros factores ecológicos, geográficos o climáticos, anteriormente mencionados podrían también influir, resulta claro que por debajo de casi todos los factores que facilitan la aparición del dengue se encuentran subyacentes las consecuencias de la negativa actividad humana, y las desigualdades sociales características de nuestros días.

Deterioro de la infraestructura de la salud pública: también contribuye a empeorar la ya sombría situación, la decadencia de la mayoría de los sistemas regionales de salud pública, y como consecuencia, la baja eficiencia de los programas de control de *Aedes aegypti*, así como la legislación sanitaria obsoleta y sin efecto. Además, debido a las

restricciones económicas que enfrentan la mayoría de los países de Latinoamérica, las autoridades sanitarias muestran una preferencia hacia las actividades de contingencia para combatir las epidemias, en lugar de implementar medidas de prevención para evitar que éstas se inicien [6].

Introducción de nuevos y más complejos vectores secundarios: un potencial riesgo adicional es la introducción en la región de *Aedes albopictus*, un eficiente vector de dengue en Asia Suroriental, registrado para el continente americano por primera vez en 1985, en EUA. Este vector ha sido detectado también en varios países latinoamericanos (México, Honduras, Guatemala, Cuba, República Dominicana, Brasil y Bolivia), aunque no se ha relacionado su presencia con el aumento de la transmisión de dengue. Cabe mencionar que *A. albopictus* puede actuar como vector en áreas urbanas y rurales, y no es un antropofílico obligatorio como *A. aegypti*, por lo que en ocasiones este último es desplazado de su hábitat [6, 9, 21].

Además de los factores extrínsecos mencionados anteriormente, existen otros relacionados con la respuesta inmune del hospedero y al mismo virus como agente etiológico de la enfermedad.

Ha sido ampliamente reportado que la infección con un serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo serotipo, así como una inmunidad cruzada de corto plazo contra los otros tres serotipos [9].

Lo anterior es importante ya que entre los factores de riesgo para el desarrollo de las formas severas del dengue: fiebre hemorrágica y el síndrome de shock por dengue, se ha documentado que el más importante es la inmunidad pre-existente dada por una infección previa con el virus la cual resulta cuando una persona previamente infectada con un serotipo del virus es expuesta a un serotipo diferente.

Aunque el mecanismo patogénico de la fiebre hemorrágica y el síndrome de shock por dengue es pobremente entendida. Existe una teoría predominante la cual atribuye la alta incidencia de DH/DSS en las infecciones secundarias al fenómeno de potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE, del inglés antibody-dependent enhancement) [9, 21]. Esta teoría postula que después de un periodo inicial de protección cruzada, los anticuerpos de la primera infección permanecen reactivos contra otros serotipos del dengue pero han disminuido a niveles no neutralizantes, estos anticuerpos no neutralizantes pueden entonces mediar una incrementada recepción del virus a las células monocíticas o macrófago vía receptor, lo que conduce a un incremento en la replicación viral y activación inmune acompañada de liberación de citocinas. Se cree que las citocinas liberadas juegan un papel directo en la inmunopatogénesis del virus, debido a sus efectos proinflamatorios en las células endoteliales vasculares lo que presumiblemente conduce a las uniones con fugas y el incremento en la permeabilidad vascular [4, 21].

Además del factor inmunológico anteriormente descrito, el tiempo entre infecciones, la edad, el grupo étnico, el fondo genético del hospedero, la secuencia de los serotipos infectantes y el genotipo viral también están asociados con el desarrollo de cuadros severos de la enfermedad [21].

Los factores de hospedero como la edad, raza, presencia de anticuerpos no neutralizantes y posiblemente las enfermedades crónicas podrían actuar como presiones de selección, resultando en genotipos mas virulentos que pueden estar asociados con DH/SSD [44].

8.- Variabilidad genética del DENV

Como con otros virus, la existencia de cepas diferentes de los virus del dengue fue evidenciado primero serológicamente usando anticuerpos obtenidos de la inoculación de animales de laboratorio.

Las primeras observaciones sobre la virulencia de cepas procedieron de asociaciones clínicas y epidemiológicas, donde las formas severas estaban asociadas con brotes específicos y cepas de virus aisladas de pacientes con dengue hemorrágico. Por otra parte, otros observaron un incremento en la severidad clínica en pacientes que habían sido infectados por más de un serotipo del virus, lo que se convirtió en la conocida y antes mencionada teoría de potenciamiento dependiente de anticuerpos o ADE. Así, dos teorías opuestas de la patogénesis del dengue se desarrollaron, donde una describe a la virulencia como una característica viral y la otra relaciona la severidad de la enfermedad con el estatus inmune del huésped [21, 45].

En años recientes, ha existido un interés considerable en la descripción de la estructura genética de las poblaciones del virus del dengue así como en determinar su subyacente proceso evolutivo, ya que la evolución de los virus del dengue ha tenido un mayor impacto en la virulencia en humanos y en la epidemiología de la enfermedad alrededor del mundo.

Aunque diferencias antigénicas y genéticas en las cepas del virus han resultado evidentes, es principalmente la falta de un modelo animal de la enfermedad que ha hecho difícil la detección de diferencias en la virulencia de los virus del dengue. Sin embargo, estudios filogenéticos de cepas diferentes del virus han conducido a la asociación entre genotipos específicos (dentro de los serotipos) y la presentación más o menos severa de la enfermedad [45].

Actualmente, los virus del dengue pueden clasificarse epidemiológicamente como de bajo, medio o alto impacto, es decir algunos virus pueden permanecer en ciclos selváticos de poca o baja transmisión a humanos, otros ocasionar dengue clásico y solo algunos de los genotipos han sido asociados con el potencial de causar las formas severas: dengue hemorrágico y síndrome de shock por dengue además de dengue clásico [45].

A pesar de que los factores que contribuyen a la epidemiología del virus son complejos, estudios han sugerido que estructuras virales específicas pueden contribuir al incremento de la replicación en células blanco humanas y al incremento en la transmisión del mosquito vector; sin embargo, el estatus inmune y posiblemente el fondo genético del huésped son también determinantes de virulencia o presentación clínica [21, 45].

Lo poco que entendemos hasta hoy se ha adquirido indirectamente por la asociación de grupos evolutivos de cepas virales con sus presentaciones clínicas y epidemiológicas. Además es evidente que la ventana de tiempo existente de la cual se deriva la información es limitada, ya que no existen fósiles de virus y a que las cepas de virus han sido recientemente adquiridas y almacenadas de una forma apropiada, y de las cuales se tiene documentación para las asociaciones epidemiológicas y clínicas. Además, también padecemos de un sesgo de inclusión de cepas de virus (taxas) debido a que se obtienen muestras de los seres humanos que están enfermos (y históricamente se han analizado las de los pacientes con enfermedad más grave) y no tener suficientes muestras de vertebrados que participan en los ciclos selvático o de mosquitos [45].

Lo que se ha aclarado es que con más información de secuencias, como secuencias completas de los virus o genes completos de muchos aislados diferentes, el entendimiento de la evolución del dengue y virulencia se ha incrementado dramáticamente. Controversias actuales se centran en como interpretar esta información antes de si los virus difieren en su potencial de causar enfermedad.

Actualmente, el consenso entre los filogenetistas radica en que un gran número de taxas (cepas de virus) con largas secuencias (un gen o más) analizados por el método de máxima probabilidad (ML), con el cálculo incorporado de la tasa de transiciones/transversiones y con un soporte estadístico o bootstrap para los patrones de ramificación son probablemente suficientes para conducir a un árbol filogenético preciso para la clasificación de genotipo viral [45]. Ya que en general cuando secuencias lo

suficientemente largas se utilizan, los arboles generados de diferentes regiones del genoma usualmente corresponden o se sobrelapan, ocurriendo discrepancias solo cuando se trata de interpretar ramificaciones menores de los arboles, generalmente los grupos de genotipos permanecen sin cambios [45].

La aplicación definitiva para el entendimiento de la evolución viral se deriva de la información que puede ser útil para el control de la enfermedad. Por lo que, es importante que toda la información usada para la interpretación del árbol filogenético satisfaga ciertos estándares para que las conclusiones no sean equivocadas. La información clínica y epidemiológica relativa a las muestras o genotipos de potencial enfermedad deben claramente cumplir las definiciones de casos para la clasificación de la enfermedad sea esta DC, DH o SSD [45].

En cuanto a la cuestión de si los virus del dengue están evolucionando hacia la virulencia, ya que siguen propagándose en todo el mundo, los análisis filogenéticos y epidemiológicos sugieren que los genotipos más virulentos están desplazando a los que tienen un menor impacto epidemiológico, mientras no hay evidencia de transmisión de nueva cepas antigénicamente aberrantes [46]. Sin embargo, para los serotipos 2 y 3 del virus, parece que se han identificado los genotipos que se han distribuido más que otros genotipos y que tienen el potencial de causar DH, por lo que la transmisión de dichos genotipos esta siendo supervisada en varios países [21].

Hasta ahora, los estudios han revelado que cada uno de los 4 serotipos del virus del dengue contiene grupos filogenéticamente distintos de virus que han sido nombrados 'genotipos' (grupos de virus genéticamente similares) que son ampliamente caracterizados por su distribución geográfica los cuales, antes del advenimiento de técnicas genómicas de larga escala estos grupos o genotipos fueron identificados como 'subtipos' con frecuencia basado en fenotipos, distribución, potencial epidémico y/o severidad clínica [21, 45, 47].

La estructura geográfica actual de la diversidad del dengue esta muy sesgada a Asia, lo que apoya la hipótesis de orígenes asiáticos para las formas endémicas/epidémicas de cada serotipo a partir de ancestros selváticos de Asia. Por otro lado, dicha estructura geográfica puede reflejar diferencias inherentes en la habilidad de las cepas de distribuirse y establecerse [47]. Un ejemplo de lo anterior esta representado por DENV-2, el cual consiste de los subtipos: asiático, americano, asiático/americano (la cual representa la colonización asiática a América) y cosmopolita, nombrados así por su distribución actual mas que por sus orígenes geográficos. El DENV-1 tiene cinco subtipos incluyendo uno selvático: Asia (I), Tailandia (II), Selvático (III), Pacifico sur (IV) y América/Africa (V) [47]. Mientras que el DENV-3 se estructura en cuatro o cinco subtipos: I Sureste asiático/ Pacifico sur, II Tailandia, III Subcontinente Indio, el subtipo IV América y el subtipo V del sureste de Asia algunas veces clasificado como subtipo I. Mientras que el DENV-4 consiste de dos subtipos humanos, uno en gran parte del sureste asiático (I) y otro mayoritariamente Americano y Pacifico Sur pero con una fuente asiática (II) el cual también es referido como Indonesia [47].

La diversidad del virus del dengue de Asia a través de todos los serotipos y múltiples subtipos (tabla 1), apoyan el origen asiático aunque África no ha sido suficientemente muestreada [21, 47].

Tabla 1.- Genotipos del Virus del Dengue.

DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Cinco genotipos - uno selvático: •I Asia •II Tailandia •III Malasia •IV Pacifico sur •V América/África	Cuatro genotipos: •Americano •Cosmopolita •Asiático •Asiático – Americano.	Cuatro genotipos: •I SEA/Pacifico sur •II Tailandia •III India •IV America •(V) SEA	Dos genotipos: •I SEA •II América/SEA- Asia (Indonesia)

8.1.- Filogenia del DENV-1

La primera comparación genética de cepas de DENV-1 se reportó en 1983 usando RNA fingerprinting, donde se distinguieron tres agrupamientos geográficos (Caribe, Pacífico/Sureste asiático, y África) entre 12 diferentes cepas aisladas en diferentes momentos [45].

Subsecuentes estudios de secuenciación del gen de envoltura confirmaron los agrupamientos originales notando que no hubo correlación de secuencias específicas de aminoácidos en este gen con dengue de mayor o menor severidad clínica. Otro estudio de secuenciación usando solo 240 nucleótidos de la unión de los genes E/NS1, mostraron que 40 cepas del genotipo 1 podían ser clasificadas en 5 genotipos cuando se usa un valor de corte arbitrario del 6% de divergencia para los agrupamientos. Sin embargo, posteriormente se realizó otro estudio el cual se llevo a cabo con 180 nucleótidos del gen de envoltura, los resultados obtenidos no fueron directamente al comparables, al distinguir solamente 3 genotipos usando el mismo valor de corte del 6% [21, 45].

Siendo recientemente (2002) cuando se reportó un estudio más completo de cepas del DENV-1 donde determinaron secuencias del gen de E, lo que permitió la corrección de reportes previos, en este estudio los genotipos fueron denotados por sus aparentes orígenes geográficos (no necesariamente a donde se han distribuido) y no por números [45].

Los análisis estadísticos de validez de los patrones de ramificación (bootstrap) continúan aportando la clasificación de estos virus en cinco genotipos: selvático/Malasia, América/África, Pacífico Sur, Asia y Tailandia [45, 47].

Siendo a partir del estudio realizado por Goncalvez y colaboradores en 2002 que se sabe que el genotipo de América/África tiene el potencial de causar dengue hemorrágico ya

que se incluyeron dos muestras de pacientes de Venezuela. Además este genotipo se ha extendido a otros países o regiones geográficas en la última década. Por lo que, este genotipo sería considerado de alto impacto epidemiológico en comparación con el genotipo selvático [45].

8.2.- Filogenia del DENV-2

Los virus de Dengue pertenecientes al serotipo 2, han sido estudiados con mas detalle que aquellos que pertenecen a otros serotipos debido a su asociación con epidemias mas severas y frecuentes. En el sureste asiático, las primeras descripciones detalladas de enfermedad y epidemias fueron aquellas ocasionadas por virus que pertenecieron al serotipo 2; en América la aparición del serotipo 2 ha sido asociada con las primeras epidemias de DH en esta región.

No fue hasta que los primeros estudios de secuenciación cuando se intento identificar las diferencias genéticas entre las cepas de pacientes con dengue y los virus aislados de pacientes con dengue hemorrágico. La comparación de las secuencias del gen E de 12 virus del serotipo 2 no mostró ninguna correlación entre la gravedad de la enfermedad y los nucleótidos o aminoácidos específicos, y se llevo a una conclusión similar después de la comparación de ocho variedades del gen NS1. El análisis de secuencias de muchas cepas más del serotipo 2 dio lugar a la idea de que determinados genotipos pueden mostrar diferencias en el potencial de virulencia, lo que resulta en las epidemias de dengue hemorrágico. Rico-Hesse en 1990 llevo a cabo un estudio de 40 cepas de diferentes áreas de las regiones tropicales, durante un período de 45 años, mostró que los virus del dengue serotipo 2 se pueden clasificar en cinco genotipos mediante la comparación de las secuencias de unión de genes E/NS1 (240 nucleótidos) [45].

Posteriormente, después de un análisis de muchas otras muestras, especialmente del sureste de Asia, una región con una larga historia de epidemias de DH y numerosas

variantes co-circulantes del virus, los grupos fueron divididos en cuatro genotipos: selvático/África occidental, América, sureste asiático y Malasia/subcontinente indio. Los genotipos Americano y Malasia/subcontinente indio han sido hasta ahora aislados de pacientes con DC solamente y por lo tanto considerados de impacto epidemiológico intermedio [45].

Actualmente, la principal preocupación es que el genotipo del sureste asiático, de alto impacto epidemiológico, continua distribuyéndose a través de varios países, incluyendo Perú y México [48]. En México, la introducción del genotipo del sureste asiático ha sido gradual, con los primeros virus de casos documentados en el sur y centro de México en 1995, mientras que algunas áreas del norte de México (cerca de la frontera con Texas) siguen ocupadas por el genotipo americano [45, 49].

8.3.- Filogenia del DENV-3

El primer reporte publicado del análisis de la variación genética del serotipo 3 ocurrió en 1972. El primer análisis filogenético de estos virus requirió la comparación de las secuencias del gen E completo, distinguiendo cuatro genotipos. Otra vez, la mayoría de los genotipos pueden ser identificados por su origen geográfico, no habiendo evidencia de un grupo selvático: América, Subcontinente indio, Tailandia, Sureste asiático/Pacífico sur.

En dicho caso, el genotipo con el potencial epidémico bajo, parece estar relacionado con el que circuló en América hasta 1989, cuyos aislados provinieron de pacientes con DC. De los 80's a los 90's en América y el pacífico sur, existieron dos introducciones independientes de nuevos genotipos: el genotipo del sureste asiático asociado con grandes epidemias con DH en Tahití y Fiji y el genotipo del subcontinente indio el cual se introdujo a Centroamérica a mediados de los 90's desplazando al genotipo americano en ambas áreas [45].

El genotipo del subcontinente indio (genotipo III) ha estado asociado con epidemias que actualmente ocurren en México, Centroamérica y América del sur [24, 50, 51] .

8.4.- Filogenia del DENV-4

En 1986 se mostró que los virus del dengue serotipo 4 diferían antigénicamente y genéticamente. Siendo después de la comparación de secuencias completas del gen de E, que fue posible distinguir dos genotipos, la tasa de variación de 20 cepas alcanzaron un máximo de 6%. La inclusión de secuencias más largas (gen de envoltura y premembrana) no han podido añadir más resolución a los árboles filogenéticos pudiendo solamente resolverse 2 genotipos. La inclusión de la secuencia del gen de envoltura de un aislado selvático añade un grupo extras, así como lo observado dentro del serotipo 1 [45]. Por lo tanto, en la actualidad existen los genotipos: Malasia, sudeste asiático y Indonesia [45]. En este momento, parece que el genotipo que incluye virus de Indonesia, el Pacífico Sur, y América es la de mayor impacto epidemiológico, aunque sólo sea porque se sigue propagando a otros países, principalmente en América [45]. Es evidente que sabemos mucho menos sobre la variación genética de los virus de este serotipo ya que sus tasas de mutación en la naturaleza son bajas y que la transmisión de este virus es menor, como lo demuestra la falta de epidemias asociadas estrictamente con estos virus [45].

9.- Significancia en epidemiología molecular de la variabilidad genética de los virus del dengue

Además de las diferentes distribuciones geográficas de los genotipos del virus del dengue (figura 12), existe evidencia de que estos difieren en su potencial epidémico y virulencia y que esto representa una importante carga en la estructura de las poblaciones virales [27].

Por lo que se encuentran entre los factores de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad.



Figura 12.- Distribución global del Virus del Dengue [27]

Diversos trabajos han tratado de establecer una correlación entre un serotipo o genotipo del virus del dengue en particular y la severidad de la enfermedad sin embargo esto aun no ha sido posible teniendo solo algunos indicios de esto.

Con respecto a la asociación de severidad con serotipos del virus del dengue, se ha reportado para DENV-1 que la infección primaria resulta frecuentemente en enfermedades más severas cuando se compara con DENV-2 y DENV-4, para DENV-2 la infección secundaria se ha asociado con enfermedad más severa (con doble probabilidad de resultar en DH que DENV-4), para DENV-3 la infección primaria resulta frecuentemente en enfermedad más severa cuando se compara con DENV-2 y DENV-4. En una segunda infección, es doble la probabilidad de resultar en DH que con DENV-4. Mientras que el DENV-4 es el menos asociado con enfermedad severa [16].

En cuanto a los genotipos virales, Ricco-Hesse *et al.* en 1998 estudiaron la relación genética de Virus del Dengue serotipo 2 con el objetivo de determinar si los virus obtenidos de casos con la forma menos severa es decir fiebre del dengue tiene distinto

origen evolutivo de los obtenidos de casos de pacientes con dengue hemorrágico. Utilizando para lo anterior un total de 73 muestras del virus obtenidos de pacientes de dos localidades tailandesas durante un periodo de 32 años. Se realizó el análisis de 240 nucleótidos de la secuencia de unión de los genes de envoltura y no estructural 1 (E/NS1) del genoma del virus. La amplia distribución de muestras de pacientes con fiebre del dengue y dengue hemorrágico confirma que los virus que pertenecen al genotipo del Sureste de Asia tienen el potencial de causar la enfermedad severa, además de que ambos comparten un progenitor común [52].

Posteriormente, se analizó el genoma completo de 11 virus del dengue del serotipo 2 los cuales ocasionaban fiebre del dengue o dengue hemorrágico encontrando diferencias nucleotídicas y aminoacídicas en regiones codificantes y no codificantes del genoma, por lo que no se pudo correlacionar con la enfermedad atenuada o severa en humanos [53].

En un estudio realizado en 2005 por Cologna y colaboradores se midió si la diferencia en la replicación viral se correlaciona con el potencial de ocasionar dengue hemorrágico así como con un incremento en la transmisión del virus usando como sistemas de estudio células dendríticas humanas y mosquitos *Aedes aegypti* encontrando que los virus del genotipo americano infectaron significativamente más células dendríticas (DCs) que el genotipo asiático, sin embargo este último generó más partículas virales (RNA + y -) a los diferentes tiempos [54].

Para determinar si los distintos genotipos del Virus del Dengue 2 están mejor adaptados a la transmisión por mosquitos, Armstrong & Rico-Hesse en 2003, clasificaron filogenéticamente 15 cepas virales obteniendo 6 cepas del genotipo americano y 9 del genotipo asiático y compararon su habilidad para infectar y diseminarse en diferentes poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* encontrando que la tasa global de infección diseminada fue del 27% de 296 mosquitos probados con el serotipo SEA y de 9% de 209

probados con el serotipo AM determinando que los mosquitos fueron mas susceptibles a la infección por el genotipo del sureste asiático [55].

En el 2006 se reportó que los genotipos americano (AM) y del sureste asiático (SEA) del DENV-2 tienen diferente periodo de incubación extrínseco. Esto al observar que mosquitos infectados con el genotipo SEA desarrollaron infecciones en el intestino medio rápidamente y para los 4 días post infección el 80% fueron positivos para el virus del dengue por inmunofluorescencia, la primera evidencia de infección en glándulas salivales se encontró en segundo día y el 50% de estas fueron positivas 7 días post infección. Mientras que los mosquitos infectados con el genotipo AM quedaron muy por debajo del genotipo SEA ya que para el día 4 solo el 45% de los intestinos medios fueron positivos requiriendo 12 días para alcanzar el 80% de la tasa de infección mientras que el 50% de las glándulas salivales fueron infectadas para el día 14 post infección. La presencia temprana del virus del dengue en las glándulas salivales resultó en un incremento estimado de 2 a 65 veces de la capacidad vectorial lo cual contribuye al desplazamiento genotípico [46].

Se ha reportado que una de las principales evidencias de la diferencia del potencial epidémico y virulencia de los diferentes genotipos del dengue es el reemplazo de linaje o clado, en el cual hay un cambio abrupto en la composición genética de los virus infectantes en una población específica [27].

En cuanto a lo anterior, en 2005 en un estudio realizado en Tailandia, se reportó para el Virus del Dengue 1 (DENV-1) el reemplazo del genotipo 1 clado 1980-1994 por el clado 1990-2002. Y que durante el periodo de 1990-1994 circularon ambos.

Mientras que para el Virus del Dengue 3 (DENV-3) genotipo 1, se dio el reemplazamiento de clado a inicios de 1990 resultando en el clado 1991-2002 [36].

En cuanto al reemplazo de clados en México, se realizó un estudio en la península de Yucatán donde aislados del Virus del Dengue 2 durante el periodo de 1980-1990 se determinó que pertenecían al genotipo americano, en 1990 se observó la presencia del genotipo cosmopolita o americano y en aislados del 2001-2002 se identificó el genotipo Asiático-Americano [49] lo que constituye evidencia del reemplazo de clados en nuestro país.

III.- JUSTIFICACIÓN

El comportamiento endémico de la fiebre por dengue así como el incremento en el número de casos de dengue hemorrágico en México durante los últimos años han generado gran preocupación en todos los sectores relacionados con la salud.

Los esfuerzos para interrumpir la transmisión se han concentrado en el control vectorial; por lo que resulta importante establecer con claridad cuáles son los elementos determinantes de la transmisión del dengue para establecer medidas de control y vigilancia eficaces.

Dado que entre los factores de riesgo para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad por el virus del Dengue se encuentran el factor inmunológico el cual esta representado por la inmunidad pre-existente dada por una infección previa con el virus así como el genotipo viral infectante es de suma importancia la evaluación de estos factores.

En cuanto a los determinantes moleculares de la transmisión, el análisis filogenético de las variantes genéticas del DENV ofrecerían una visión mas clara de la relación entre las variantes existentes y la severidad de la enfermedad en nuestra población.

IV.- OBJETIVOS

1.- Objetivo general

Identificar y analizar las variantes genéticas de los virus del dengue circulantes, así como su asociación en la dinámica de la transmisión de estos en el estado de Nuevo León, México.

2.- Objetivos específicos

2.1.- Aislar e identificar las variantes genéticas del virus del dengue circulantes en Nuevo León en el período de Junio del 2010 a Mayo del 2011.

2.2.- Determinar la memoria inmunológica existente en habitantes del estado de Nuevo León, México contra el virus del dengue en periodos epidémicos e interepidémicos.

2.3.- Analizar las variantes genéticas del virus del dengue aisladas y su asociación con la dinámica de la transmisión en las áreas estudiadas.

V.-ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio estuvo comprendida por el estado de Nuevo León (figura 13) el cual se encuentra en el noreste de la República Mexicana. Tiene una superficie de 64,220 km², lo cual representa el 3.3% de la superficie total del país.

El estado de Nuevo León se encuentra limitado al norte y al este por Tamaulipas; al sur y al oeste por San Luis Potosí y Zacatecas; y al norte por Coahuila, Tamaulipas y el estado norteamericano de Texas siendo las coordenadas geográficas de sus extremos: al norte 27° 49' y al sur 23° 11' de latitud norte. Al este 98° 26' y al oeste 101° 14' de longitud oeste.

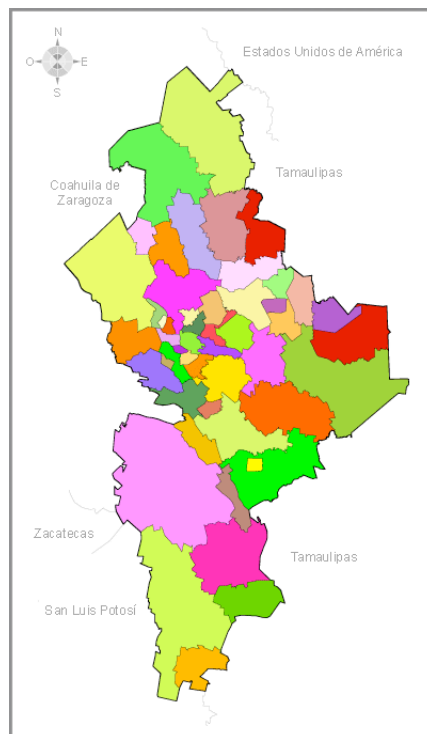


Figura 13.- Área de estudio

El estado de Nuevo León tiene 51 municipios sin embargo su área metropolitana está formada por 9 los cuales son: Monterrey, San Pedro Garza García, Santa Catarina, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, Apodaca, General Escobedo y Juárez (Figura 14).



Figura 14.- Área metropolitana del estado de Nuevo León

Cuenta con una población de 4,199,292 lo que representa aproximadamente el 4.0% de la población total del país, de la cual 3.7 millones viven en el municipio de Monterrey que es la capital de este estado.

El clima es principalmente caluroso y seco, pero tiene temperaturas templadas en las áreas más altas, heladas en invierno y una fuerte temporada de lluvias a veces acompañada de huracanes.

La capital (Monterrey) tiene una temperatura promedio de 23°C, aunque suele llegar a los 40°C en verano y a menos de 0°C en invierno. La humedad promedio es de 62% y hay lluvias fuertes durante los meses de Agosto, Septiembre y Octubre.

VI.- METODOLOGÍA

Para cumplir con el objetivo de este trabajo se siguió la metodología descrita en este apartado y esquematizada en la figura 15.

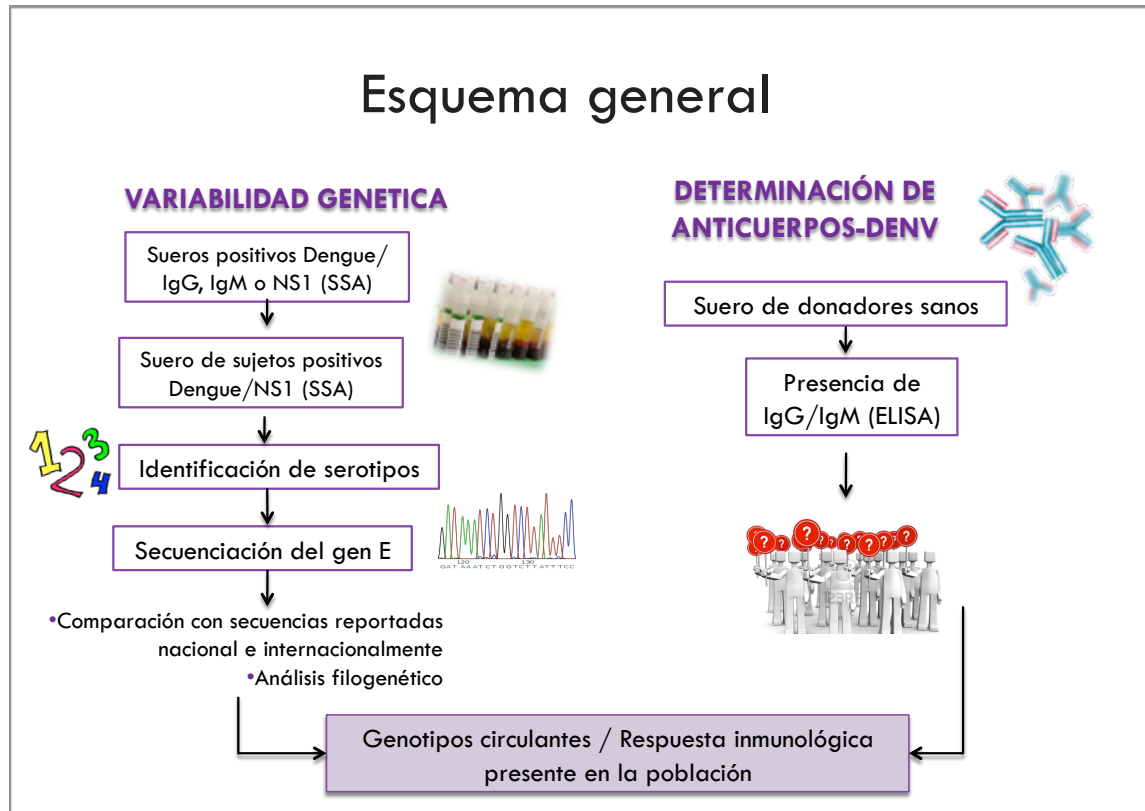


Figura 15.- Esquema general de la metodología.

Destacando que para el control de calidad de los procedimientos aquí descritos se utilizaron controles positivos y negativos, así como valores de referencia.

a) Serotipificación

Control positivo: Sueros positivos para los diferentes serotipos o cultivos celulares infectados con los diferentes serotipos del virus del dengue.

Control negativo: Agua

Valores de referencia para qPCR:

Muestras con Ct menores o iguales a 35 son positivas.

Muestras con Ct entre 36 y 38, se repiten por duplicado.

Muestras con Ct mayores o iguales a 40 son negativas.

b)PCR gen E

Todas las muestras de pacientes deberán correrse a la par con controles negativos y positivos y se excluyeron los resultados en los que:

- a) El control positivo no presente las bandas de amplificación del tamaño esperado.
- b) El control negativo presente cualquier banda de amplificación.
- c) Cuando no se corra cualquiera de los controles especificados.

1.- Pruebas moleculares

1.1.- Muestras biológicas

La muestra a utilizar fue suero de pacientes febriles que presenten a su vez dos o más signos de infección por virus del Dengue según la clasificación descrita en la NOM017-SSA2-1994.

A cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, se les tomo una muestra de sangre (~5 mL) en tubos vacutainer al vacío usando tubos sin anticoagulante para suero (tapa roja), se separó el suero y se almacenó de 2 a 8°C hasta 72 horas o congeló a -70°C o menor. En caso de que se requiriera el transporte de la muestra, fue en red fría de 2 a 8°C o congelada.

1.2.- Determinación del antígeno viral (NS1) por ELISA

El suero de pacientes sospechosos de la infección con dengue fue posteriormente sometido a una prueba serológica de ELISA para la detección de la proteína no estructural del virus NS1 mediante el kit comercial PanBio No. catálogo E-DEN01P. Siguiendo las recomendaciones del fabricante descritas a continuación:

- 1.-Colocar 100 µl de muestras diluidas y controles en sus respectivos micropozos.
- 2.-Cubrir la placa e incubar por 1 hora a 37°C ± 1°C.

- 3.-Lavar seis (6) veces con buffer de lavado diluido.
- 4.-Colocar 100 µl de HRP conjugado anti-NS1 Mab a cada pozo.
- 5.-Cubrir la placa e incubar por 1 hora a 37°C ±1°C.
- 6.-Lavar seis (6) veces con buffer de lavado diluido.
- 7.-Colocar 100 µl de TMB a cada pozo.
- 8.-Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) a partir de la primera adición. Se desarrollara un color azul.
- 9.- Agregar 100 µl de solución de paro a todos los pozos en la misma secuencia y tiempo sincronización de la adición de TMB. Mezclar bien. El color azul cambiara a amarillo.
- 10.- Dentro de 30 minutos leer la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia entre 600-650 nm.

Una vez que se determinó la presencia del antígeno viral NS1 se procedió a la confirmación y serotipificación por qPCR y PCR.

1.3.- Serotipificación por qPCR

Para llevar a cabo la serotipificación por qPCR se llevó a cabo la extracción del ARN del virus, esto a partir del suero del paciente que resulto positivo para la presencia de la proteína NS1.

1.3.1.- Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo usando el MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit. El ARN una vez eluido se procesó o almacenó hasta su procesamiento a -70 °C.

Una vez extraído el ARN se realizó en un solo paso la retrotranscripción y una reacción de qPCR con el objetivo de detectar y serotipificar el DENV.

1.3.2.- Transcripción reversa del ARN viral y qRT-PCR múltiplex

Con el objetivo de serotipificar el virus se realizó en un solo paso una retrotranscripción y una qPCR múltiplex para lo que se utilizó el Super Script III Platinum One Step qRT-PCR System.

En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron para la retrotranscripción (mFU1 y CFD2) así como las sondas para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con una variante múltiplex de un solo paso. En este procedimiento para cada serotipo del virus se usaron sondas marcadas con diferentes fluoróforos (sonda D1, sonda D2, sonda D3 y sonda D4) haciendo posible la detección así como la serotipificación simultánea del virus del dengue presente en la muestra [56].

Tabla 2.- Oligonucleótidos y sondas para la retrotranscripción y qPCR múltiplex de un solo paso.

Primer	Secuencia 5'-3'	Longitud (nt)
mFU1	TAG AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AAA AA	29
CFD2	GTG TCC ACG CCG GCG GTG TCA TCA GC	26
Sonda D1	FAM- TCA GAG ACA TAT CAA AGA TTC CAG GGG G –BHQ1	28
Sonda D2	TEXAS RED - AAG AGA CGT GAG CAG GAA GGA AGG GGG AGC – BHQ2	30
Sonda D3	CY5- TGA GAG ATA TTT CCA AGA TAC CCG GAG GAG – BHQ3	30
Sonda D4	HEX- TGG AGG AGA TAG ACA AGA AGG ATG GAG ACC- BHQ1	30

En la tabla 3 se especifica la mezcla de reacción utilizada para la retrotranscripción y qPCR múltiplex para la serotipificación del virus del dengue en un solo paso mientras que el programa que se empleo se describe en la tabla 4.

Tabla 3.- Mezcla de reacción de RT-qPCR múltiplex

Reactivos	X1 Vol (µl)
Super Script Buffer 2X	12.5
H ₂ O calidad PCR	6.55
Primer Fw Mfu1	0.125
Primer Rv CFD2	0.125
D1-Probe	0.05
D2-Probe	0.05
D3-Probe	0.05
D4-Probe	0.05
Enzima kit	0.5
RNA viral	5
Total	25

Tabla 4.- Programa de retrotranscripción y qPCR múltiplex para la serotipificación.

Temperaturas (°C)	Tiempo		Paso
50	30 minutos		Retrotranscripción
95	15 minutos		Activación de la Taq
50	30 segundos		
72	1 minuto		
95	15 segundos	45 ciclos	
48	3 minutos		
15	∞		
Fin			

Una vez determinado el serotipo del virus del dengue presente en la muestra se realizó la transcripción reversa del ARN viral.

1.4.- Transcripción reversa del ARN viral

Una vez conocido el serotipo del DENV presente en la muestra se realizó la transcripción reversa con el objetivo de obtener el ADNc lo cual se realizó empleando SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat# 18080044) y Random Primers según el protocolo que se describe a continuación.

Se preparó una mezcla de reacción “A”, la cual se describe en la tabla 5. Se incubaron los tubos a 65°C por 3 minutos.

Tabla 5.- Mezcla de reacción “A”

Reactivo	Volumen (µl)
ARN viral	8
Random primers	1
dNTP's	1

Posteriormente se preparó una segunda mezcla de reacción “B” con las especificaciones descritas en la tabla 6.

Tabla 6.- Mezcla de reacción “B”.

Reactivos	Volumen (µl)
10X RT Buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0.1 M DTT	2
RNaseOut 40u/µl	1
SuperScript III	1

La mezcla resultante de las mezclas de reacción 1 y 2 fue de 20 µl. La cual fue sometida al programa de temperaturas descrito en la tabla 7 para la retrotranscripción de ARN viral.

Tabla 7.- Programa de temperaturas para la retrotranscripción.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
60	42
15	70
∞	4

Una vez terminado el programa, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su almacenaje a -20°C.

1.5.- Amplificación del gen de Envoltura (Env) del Virus del Dengue.

1.5.1.- Diseño de iniciadores u oligonucleótidos

Para la amplificación del gen de envoltura (Env) del DENV se diseñaron 3 pares de iniciadores mediante el programa PrimerSelect (DNASTAR, Lasergene) utilizando como referencia la secuencia del genoma completo del Virus del Dengue 1 con número de acceso del GenBank NC_001477. Los iniciadores diseñados (Tabla 8) se sobrelapan para obtener la amplificación del gen de envoltura completo a manera de fragmentos de aproximadamente 500 nt de longitud siendo posible de esta forma su utilización en secuenciación.

Tabla 8.- Primers para la amplificación y secuenciación del gen de envoltura del DENV.

Primer	Secuencia 5'-3'	Región	Producto esperado (pb)
D1_14U	GCGCCGGGAAACAAATACAAAG	Env- 5'	824
D1_837L	CCCCGAAGTCCAAGGCAGTG		
D1_703U	GGAGCCCTCACATTGGACTG	Env-centro	739
D1_1442	ATAGAACCGAAGTCCCATGC		
D1_1348U	AAGGGAAGCAGTATAGGGAAAATGT	Env-3'	445
D1_1792L	CAATGGCCGCTGATAGTCTCTTAG		

1.5.2.- Amplificación de un segmento del DENV por PCR

La amplificación del gen de envoltura se realizó mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo que se preparó la mezcla de reacción que se describe en la tabla 9 utilizando la DNA polimerasa Pfu Ultra II Fusion Hot Start (Agilent Technologies), bajo el programa de temperaturas que se muestra en la tabla 10 utilizando para ello un termociclador iCycler (BioRad, USA).

Tabla 9.- Mezcla de reacción PCR gen E

Reactivo	1X (µl)
H ₂ O (Molecular Grade)	12
Buffer Pfu II	2.5
dNTP's	5
Primer forward	1
Primer reverse	1
Pfu II	0.5
Muestra (cDNA)	2
Volumen Final	25

Tabla 10- Programa de PCR para la amplificación del gen Env

Temperatura (°C)	Tiempo	
95	2 minutos	
95	30 segundos	X40
51	30 segundos	
72	45 segundos	
72	2 minutos	
4	∞	

Finalmente, la detección de los productos de amplificación se realizó por análisis electroforético en geles de agarosa al 0.5% con buffer TBE 1X (Tris HCl 1 M, ácido bórico 1M y EDTA 0.5mM) teñidos con bromuro de etidio y vistos en el transiluminador con luz ultravioleta Bio-Rad UV Transilluminator (BioRad, USA). Además, se utilizó el marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) para estimar el tamaño del producto amplificado.

1.6.- Secuenciación genómica del DENV

Una vez realizada la amplificación se procedió a la purificación de los productos de PCR con el objetivo de su preparación para la secuenciación. Esto se realizó utilizando el reactivo ExoSAP-IT (USB) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se indica que el reactivo ExoSAP-IT se mezcla directamente con el producto de PCR en una relación 2:5 (μ l) respectivamente, posteriormente dicha mezcla es sometida a una incubación de 15 minutos a 37 °C seguida de una segunda incubación de 15 minutos a 80 °C para la inactivación de la enzima.

Ambos sentidos de los fragmentos de DNA purificados fueron secuenciados utilizando los iniciadores forward o reverse con los que se generaron, la secuenciación se llevó a cabo en el UH Manoa Advanced Studies in Genomics, Proteomics and Bioinformatics utilizando el secuenciador Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA).

1.7.- Análisis de la secuencia

Una vez obtenida la secuencia se empleó el software Sequencher 5.0 (Gene Code Corp.) para la edición, ensamblado y alineamiento del gen de envoltura del virus del dengue, los alineamientos fueron verificados utilizando Se-AL 2.0 [65].

Con el objetivo de proveer un contexto para su interpretación posterior se incluyeron en el alineamiento 33 secuencias de referencia previamente reportadas (tabla 13) que proporcionaron información de los genotipos del DENV-1, ubicación geográfica y contexto temporal.

Se empleó el software TranslatorX empleando las opciones de suponer el marco de lectura más probable y alineamiento de proteína con el método de MAFFT, para la generación de un contig el cual fue guardado con extensión phylip (.phy), el cual fue

posteriormente importado a RAxML black box web server [57][66], para el análisis filogenético.

El análisis filogenético se realizó con el método de Maximum Likelihood (ML) utilizando el modelo de sustitución GTR+I+G. Y un soporte de 100 replicaciones (ML bootstrap).

Una vez obtenidos los arboles filogenéticos, estos fueron descargados y visualizados en el software FigTree v.1.3.1.

2.- Pruebas para el DENV

2.1.- Muestras biológicas

Las muestras empleadas en este apartado fueron colectadas en el Banco de Sangre del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, durante el periodo comprendido del 29 de Septiembre del 2010 al 2 de Mayo del 2011, con un total de 1002 muestras colectadas, cabe mencionar que todas las muestras fueron tomadas previa firma del consentimiento informado (anexo A).

El procedimiento para la obtención de la muestra fue el siguiente: se emplearon tubos de tapa roja para la toma de la muestra. Una vez identificados los tubos de cada donador se procedió a la desinfección de la zona con solución antiséptica Isodine® seguido de la venopunción mediante el sistema Vacutainer®, se obtuvieron aproximadamente 5 mL de sangre venosa de cada donador. Una vez obtenida la muestra se transportó en red fría de 4-8°C al laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. donde se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos para su coagulación posteriormente se separó el suero, el cual se almacenó en alícuotas de 500 µl a -20°C hasta su procesamiento por ELISA. Cabe mencionar que se descartaron las muestras de suero hemolisado, lipémico o con crecimiento bacteriano.

2.2.- Pruebas de ELISA

Previo al ensayo se debe comprobar que todos los reactivos se han estabilizado a temperatura ambiente (20-25°C) antes de comenzar el ensayo, ya que si se realiza el ensayo fuera de los intervalos de tiempo y temperatura que se indican, se pueden obtener resultados inválidos por lo que deberán repetirse todos los ensayos que no estén comprendidos en los tiempos e intervalos de temperatura establecidos.

Posteriormente se debe extraer el número necesario de micropocillos de la bolsa de aluminio e insertarlos en el soporte de tiras. Se necesitan cinco micropocillos para el Control Negativo (N), el Control Reactivo (R) y el Calibrador (CAL) por triplicado. Comprobar que el resto de los micropocillos no utilizados se guardan en la bolsa de aluminio bien sellada.

Se realiza una predilución del suero y posteriormente se diluye el control negativo, el control reactivo o positivo, el calibrador y las muestras del paciente: Añadir 1000 µL de diluyente de muestra a 10 µL de suero. Alternativamente se puede añadir 90 µL de diluyente de muestra a 10 µL de suero. Tomar 20 µL del suero diluido y agregar 180 µL de diluyente de muestra. Mezclar bien.

2.2.1.-Procedimiento de ELISA para la detección de IgG

La detección de anticuerpos del tipo IgG en suero se realizó mediante el estuche comercial PanBio No. catálogo E-DEN02G (PANBIO Pty Ltd, Australia). Para el estudio se siguieron las recomendaciones del fabricante descritas a continuación:

Antígeno

1.-Determinar el número necesario de pocillos para el ensayo. Diluir el antígeno 1/250 utilizando el diluyente de antígeno. Se recomienda diluir como mínimo 10 µL de

antígeno en 2.5 mL de diluyente de antígeno. Esta cantidad es suficiente para cinco tiras (40 pocillos). Es necesario un volumen de 0.5 mL de antígeno diluido por tira. Una vez que se ha añadido el antígeno al diluyente de antígeno, la solución adquiere un color rojo pálido. Asegúrese de que el antígeno concentrado no utilizado permanece a 2-8°C.

2.-Extraer el volumen necesario de antígeno diluido y mezclar con un volumen igual de trazador de MAb en un vial limpio de plástico o de vidrio. Mezclar suavemente la solución de antígeno y trazador de MAb y dejar a temperatura ambiente (20-25°C) hasta que se necesite (es necesario incubar durante 60 minutos). Desechar el antígeno diluido no utilizado.

Placa de ensayo

3.-10 minutos después de mezclar el Trazador de MAb y el antígeno diluido, pipetear 100 µL de muestra del paciente diluida y de los Controles diluidos en sus respectivos micropocillos. Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos a 37°C ± 1°C.

4.-Lavar seis (6) veces con el buffer de lavado diluido.

5.-Mezclar la solución antígeno-trazador MAb antes de realizar la transferencia. Pipetear 100 µL de complejos antígeno-MAb del vial de antígeno a los pocillos apropiados de la placa de ensayo. Cubrir la placa e incubar durante 60 minutos a 37°C±1°C.

6.-Lavar seis (6) veces con buffer de lavado diluido.

7.-Pipetear 100 µL de TMB en cada pocillo.

8.-Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), cronometrando desde la primera adición. Aparecerá un color azul.

9.-Pipetear 100 µL de solución stop en todos los pocillos en la misma secuencia y cronometrando igual que cuando se añadió TMB. Mezclar bien. El color azul se volverá amarillo.

10.-Antes de los 30 minutos leer la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm. Si se dispone de un espectrofotómetro de doble longitud de onda, fijar el filtro de referencia entre 600-650

nm. La lectura de los micropocillos a 450 nm sin filtro de referencia puede dar como resultado valores de absorbancia mayores por el ruido de fondo.

2.2.2.- Procedimiento de ELISA para la detección de IgM

La detección de anticuerpos del tipo IgM en suero se realizó mediante el estuche comercial PanBio No. catálogo E-DEN01M (PANBIO Pty Ltd, Australia), siguiendo las recomendaciones del fabricante descritas a continuación:

Antígeno

1.-Determinar el número de pocillos requerido para el ensayo. Diluir el antígeno 1/250 con el Diluyente del Antígeno. Se recomienda diluir, como mínimo, 10 µL del antígeno en 2.5mL del Diluyente del Antígeno. Esta cantidad es suficiente para trabajar con un máximo de cinco tiras (40 pocillos). Para cada tira de pocillos se requiere un volumen de 0.5 mL del antígeno diluido. Una vez que se añade el antígeno al Diluyente del Antígeno, la solución adquiere un color azulado. Comprobar que el antígeno concentrado que no se ha utilizado se mantiene a 2-8°C.

2.-Extraer el volumen requerido de antígeno diluido y mezclar con el mismo volumen de AcMo (trazador) en un vial limpio de vidrio o de plástico. Mezclar suavemente la solución de antígeno y AcMo (trazador) y dejar reposar a temperatura ambiente (20-25°C) hasta que se necesite. Desechar el antígeno diluido que no se haya utilizado.

Placa de ensayo

3.-En los 10 minutos siguientes a la mezcla del AcMo (trazador) y del antígeno diluido, añadir 100 µL de la muestra del paciente diluida y de los controles en los pocillos correspondientes.

4.-Cubrir la placa e incubarla durante 1 hora a 37°C ± 1°C.

5.-Lavar seis (6) veces con tampón de lavado diluido.

- 6.-Mezclar la solución del antígeno-AcMo (trazador) antes de pipetearse. Añadir 100 μ L de los complejos antígeno-AcMo a los pocillos correspondientes de la placa.
- 7.-Cubrir la placa e incubarla durante 1 hora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 8.-Lavar seis (6) veces con el buffer de lavado diluido.
- 9.-Pipetear 100 μ L de TMB a cada pocillo.
- 10.-Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$), cronometrando desde la primera adición. Aparecerá un color azul.
- 11.-Pipetear 100 μ L de la solución de stop en todos los pocillos en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que para la adición de TMB. Mezclar bien. El color azul cambiará a amarillo.
- 12.-Antes de 30 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm. Si se dispone de un espectrofotómetro de doble longitud de onda, fijar el filtro de referencia entre 600-650 nm. Si se leen los micropocillos a 450 nm sin un filtro de referencia, se pueden obtener valores de absorbancia superiores debido al fondo.

VII.- RESULTADOS

1.- Genomas virales

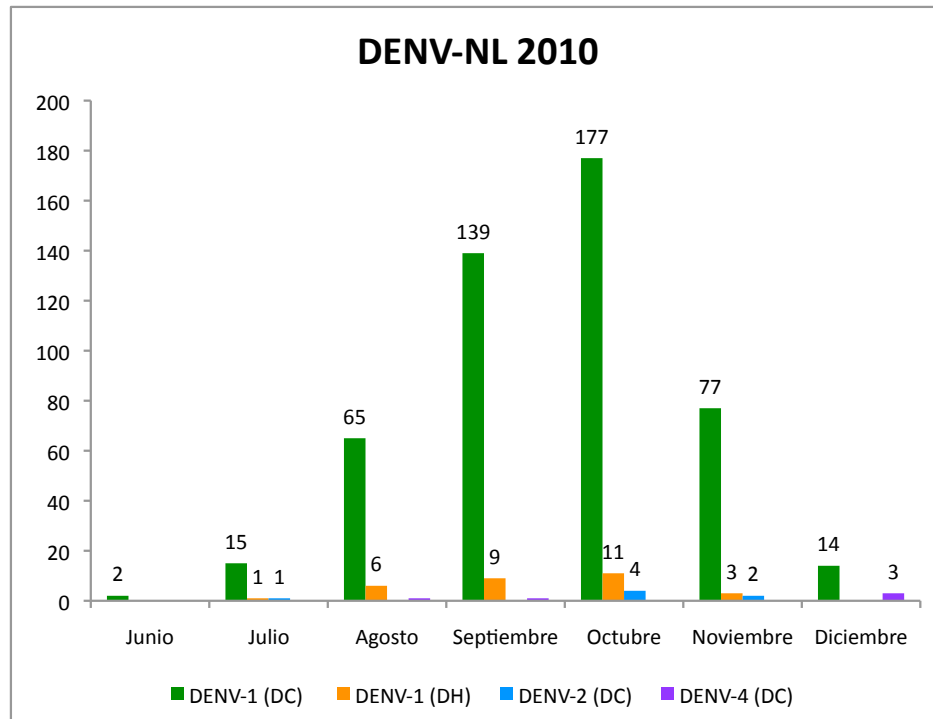
Como parte de este trabajo se obtuvieron un total de 584 ARN virales los cuales según la serotipificación correspondieron a los serotipos 1, 2 y 4 y cuyo diagnóstico clínico de caso fue principalmente de dengue clásico (Tabla 11).

Tabla 11.- Genomas virales obtenidos según serotipo y diagnóstico clínico.

	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Total
DC	542	7	0	5	554
DH	30	0	0	0	30
Total	572	7	0	5	584

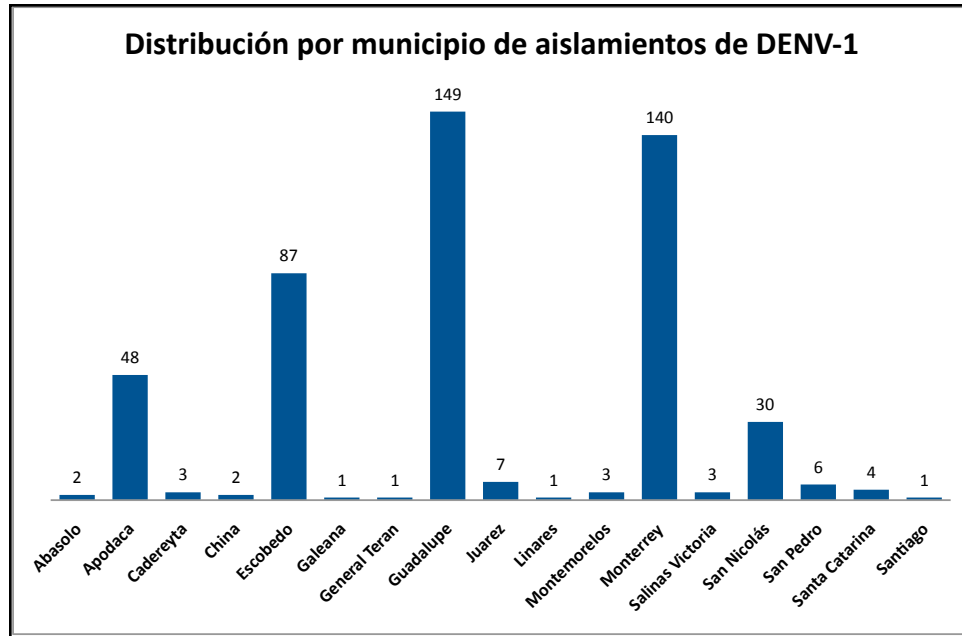
Por otro lado, según la información epidemiológica la distribución temporal de los aislamientos se observa que la mayoría de los casos se presentaron en los meses de Septiembre y Octubre del 2010 con 139 y 177 aislamientos respectivamente (Gráfica 1).

Gráfica 1.- Distribución mensual de los aislamientos de DENV en Nuevo León.



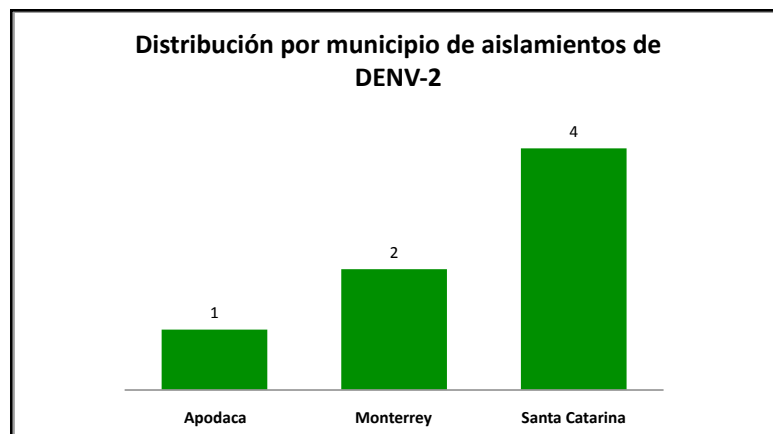
En cuanto a la distribución geográfica de los genomas virales aislados, estos se ubicaron principalmente en el área metropolitana de Monterrey, siendo los municipios de Guadalupe, Monterrey, Escobedo, Apodaca y San Nicolás los que tuvieron un mayor número de genomas del DENV-1 aislados (Gráfica 2).

Gráfica 2.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-1.



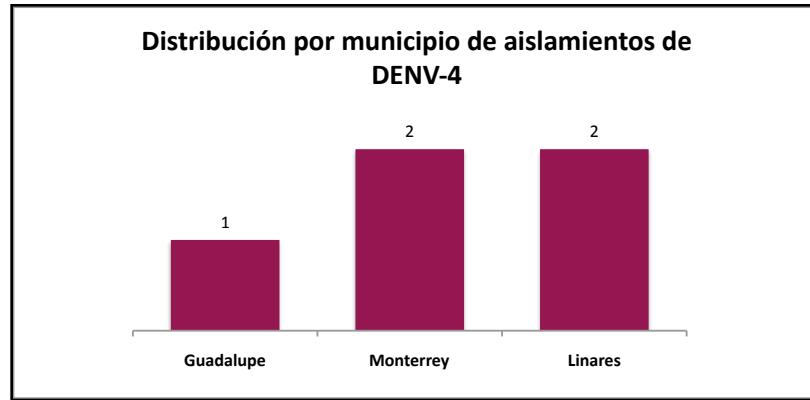
En cuanto al DENV-2, los genomas aislados procedieron de los municipios de Santa Catarina, Monterrey y Apodaca (Gráfica 3).

Gráfica 3.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-2.



Mientras que para DENV-4 Monterrey y Linares presentaron el mismo número de genomas aislados seguidos del municipio Apodaca (Gráfica 4).

Gráfica 4.- Distribución por municipio de los genomas aislados del DENV-4.



De las 584 muestras colectadas solo se contó con información epidemiológica de 531(53 casos sin datos), obtenida de las fichas de recolección que acompañan a cada una de las muestras.

En cuanto a la proporción de hombres y mujeres que padecieron dengue fue de 50% cada uno con 266 casos, respectivamente. Además, de 5 casos sin datos de género. Mientras que en cuanto a la distribución de los casos con respecto a la edad 341 se presentaron en mayores de 18 años y 190 en menores de 18 años destacando que no hubo datos de edad en 6 casos.

2.- Amplificación del gen de envoltura (E) del DENV

A continuación, se observan los resultados de amplificación del gen de envoltura del virus del dengue de algunas de las muestras que se procesaron durante este trabajo, se emplearon 3 pares de iniciadores (Tabla 9) esperando obtener amplicones de 824 pb para el extremo 5' , 739 para el centro y 445 pb para el extremo 3' del gen E (Figura 16).

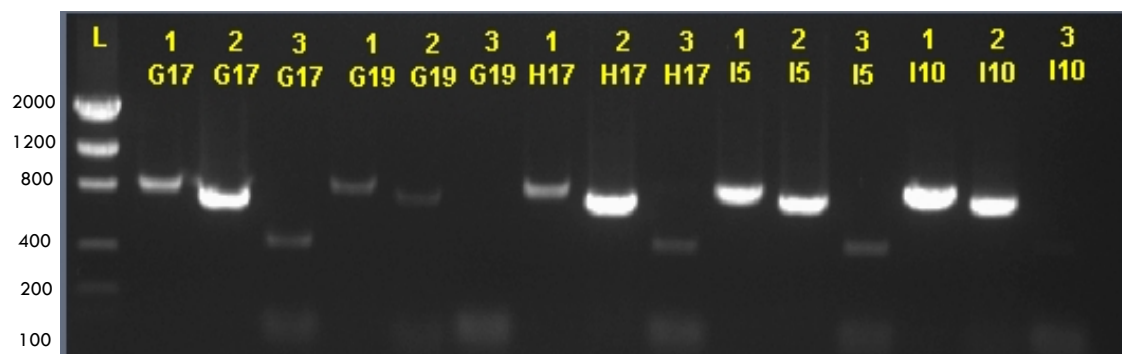


Figura 16.- Amplificación del gen de Envoltura del DENV.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica correspondiente al gen que codifica a la proteína de envoltura (E) del virus del dengue (DENV) de 36 aislados. Los datos clínicos y epidemiológicos de las secuencias obtenidas se muestran en la tabla 12 donde se reporta la clave de identificación de las cepas. Dicha clave resume: Serotipo del DENV/ País de aislamiento/ Nombre / Año de aislamiento, además la tabla incluye información sobre la localidad de aislamiento, el diagnóstico clínico el género y edad del paciente.

Tabla 12.- Datos clínicos y epidemiológicos de los aislados utilizados en este estudio.

Clave de identificación	Localidad	Mes de aislamiento	Diagnóstico clínico	Género	Edad
D1/MX/A3/2010	Escobedo, N.L.	9	DC	F	7
D1/MX/A4/2010	Monterrey, N.L.	9	DC	M	43
D1/MX/A8/2010	Monterrey, N.L.	9	DC	F	31
D1/MX/A9/2010	Guadalupe, N.L.	9	DC	F	22
D1/MX/B13/2010	Monterrey, N.L.	10	DH	M	15
D1/MX/B14/2010	Guadalupe, N.L.	10	DH	F	24
D1/MX/B15/2010	Guadalupe, N.L.	9	DH	M	20
D1/MX/B20/2010	San Nicolás, N.L.	10	DC	M	13

Clave de identificación	Localidad	Mes de aislamiento	Diagnóstico clínico	Género	Edad
D1/MX/C4/2010	Apodaca, N.L.	9	DC	M	7
D1/MX/C7/2010	San Nicolás, N.L.	10	DC	F	35
D1/MX/C8/2010	Guadalupe, N.L.	11	DH	F	19
D1/MX/C10/2010	Apodaca, N.L.	9	DH	F	46
D1/MX/C13/2010	Escobedo, N.L.	6	DC	M	10
D1/MX/D7/2010	Escobedo, N.L.	10	DH	F	46
D1/MX/D11/2010	Monterrey, N.L.	8	DH	M	84
D1/MX/E3/2010	Apodaca, N.L.	9	DH	M	11
D1/MX/E12/2010	Monterrey, N.L.	10	DC	M	13
D1/MX/E18/2010	Monterrey, N.L.	10	DC	F	24
D1/MX/F6/2010	Guadalupe, N.L.	9	DH	M	9
D1/MX/F10/2010	Monterrey, N.L.	11	DC	M	18
D1/MX/F12/2010	Guadalupe, N.L.	10	DC	M	11
D1/MX/F17/2010	Santa Catarina, N.L.	9	DH	F	24
D1/MX/G2/2010	San Pedro, N.L.	10	DC	F	4
D1/MX/G7/2010	Guadalupe, N.L.	8	DC	M	16
D1/MX/G20/2010	Apodaca, N.L.	11	DC	F	35
D1/MX/H3/2010	Guadalupe, N.L.	8	DH	F	27
D1/MX/H11/2010	Juaréz, N.L.	10	DC	F	11

Clave de identificación	Localidad	Mes de aislamiento	Diagnóstico clínico	Género	Edad
D1/MX/H17/2010	Guadalupe, N.L.	11	DC	M	1
D1/MX/I5/2010	Guadalupe, N.L.	9	DC	M	10
D1/MX/I8/2010	San Pedro, N.L.	9	DC	M	10
D1/MX/I11/2010	Abasolo, N.L.	10	DC	M	17
D1/MX/I15/2010	Monterrey, N.L.	10	DC	F	35
D1/MX/I19/2010	Escobedo, N.L.	11	DC	F	13
D1/MX/J7/2010	Guadalupe, N.L.	10	DH	F	14
D1/MX/J8/2010	Escobedo, N.L.	10	DH	M	50
D1/MX/J10/2010	Guadalupe, N.L.	11	DC	F	6

3.- Análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético para entender la relación genética y evolutiva entre los aislados de DENV-1 obtenidos, lo anterior empleando el método de máxima probabilidad (Maximum Likelihood) para la generación de dos árboles filogenéticos utilizando valores de bootstrap de 100 replicaciones.

El primero de ellos provee un contexto genotípico para los 36 aislados obtenidos de Nuevo León, México 2010, además, examina si existe evolución *in situ* o si ha ocurrido introducción de múltiples fuentes, lo anterior mediante la inclusión de 33 secuencias de referencia disponibles públicamente (Tabla 13), las cuales representaron los genotipos de: I Asia, II Tailandia, IV Pacífico Sur y V América-África (Figura 17 y anexo B).

Tabla 13.- Secuencias de referencia del DENV-1 utilizadas para el análisis filogenético.

Genotipo	Identificación	Número de Acceso (GeneBank)	País	Año
I Asia	D1/JP/Mochizuki/1943	AB074760	Japón	1943
I Asia	D1/TH/PUO_359/1980	AF425630	Tailandia	1980
I Asia	D1/CN/GZ_80/1980	AF350498	China	1980
I Asia	D1/KH/658/1998	AF309641	Camboya	1998
I Asia	D1/DJ/606/1998	AF298807	Djibouti	1998
I Asia	D1/TH/0008/1981	AY732483	Tailandia	1981
I Asia	D1/TH/0336/1991	AY732477	Tailandia	1991
I Asia	D1/TH/0488/1994	AY732475	Tailandia	1994
I Asia	D1/TH/0102/2001	AY732479	Tailandia	2001
II Tailandia	D1/TH/SMAN/1954	D10513	Tailandia	1954
II Tailandia	D1/TH/2543/1963	AF425629	Tailandia	1963
II Tailandia	D1/TH/16007/1964	AF180817	Tailandia	1964
IV Pacífico Sur	D1/US/Hawaii/1945	AF425619	Estados Unidos	1945
IV Pacífico Sur	D1/NR/WestPac/1974	U88535	Nauru	1974
IV Pacífico Sur	D1/PH/228682/1974	AF425627	Filipinas	1974
IV Pacífico Sur	D1/AU/HTI7/1983	AF425612	Australia	1983
IV Pacífico Sur	D1/ID/A88/1988	AB074761	Indonesia	1988
IV Pacífico Sur	D1/TH/AHF82/1980	D00502	Tailandia	1980
IV Pacífico Sur	D1/PH/836_1/1984	D00503	Filipinas	1984
V América/África	D1/JM/1636/1977	D00501	Jamaica	1977
V América/África	D1/MX/1298/1980	AF425623	México	1980
V América/África	D1/MX//BID-V3746/2008	GQ868530.1	México	2008
V América/África	D1/CI/DakarA_1520/1985	AF425620	Costa de Marfil	1985
V América/África	D1/AW/495_1/1985	AF425609	Aruba	1985

Genotipo	Identificación	Número de Acceso (GeneBank)	País	Año
V América/África	D1/TT/86471/1986	AF425639	Trinidad y Tobago	1986
V América/África	D1/BR/BR_90/1990	S64849	Brazil	1990
V América/África	D1/PE/DEI151/1991	AF425626	Peru	1991
V América/África	D1/CO/371869/1996	AF425617	Colombia	1996
V América/África	D1/VE/28164/1997	AF425634	Venezuela	1997
V América/África	D1/BR/BH584526/1997	AF425614	Brazil	1997
V América/África	D1/CI/Abijan1056/1999	AF298808	Costa de Marfil	1999
V América/África	D1/TH/D81_135/1981	M32925	Tailandia	1981
V América/África	D1/TH/0442/1980	AY732476	Tailandia	1980

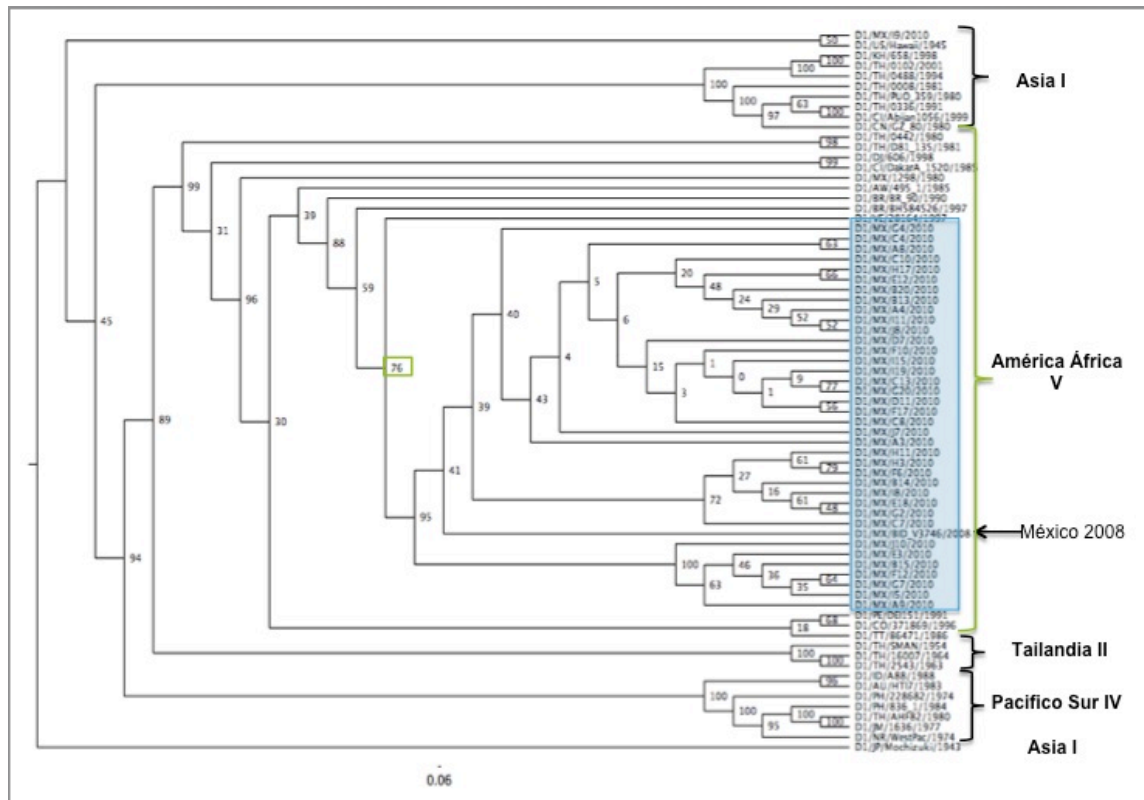


Figura 17.- Árbol filogenético mostrando contexto genotípico.

Mientras que el segundo árbol filogenético (figura 18 y anexo C) consiste de los aislados de Nuevo León enraizados con cepas aisladas de México en años previos (2006, 2007 y 2008), ya que como grupo externo examina si los aislados de Nuevo León forman un clado distinto y único a partir de secuencias de México y América Latina (Venezuela 1997 y Nicaragua 2008).

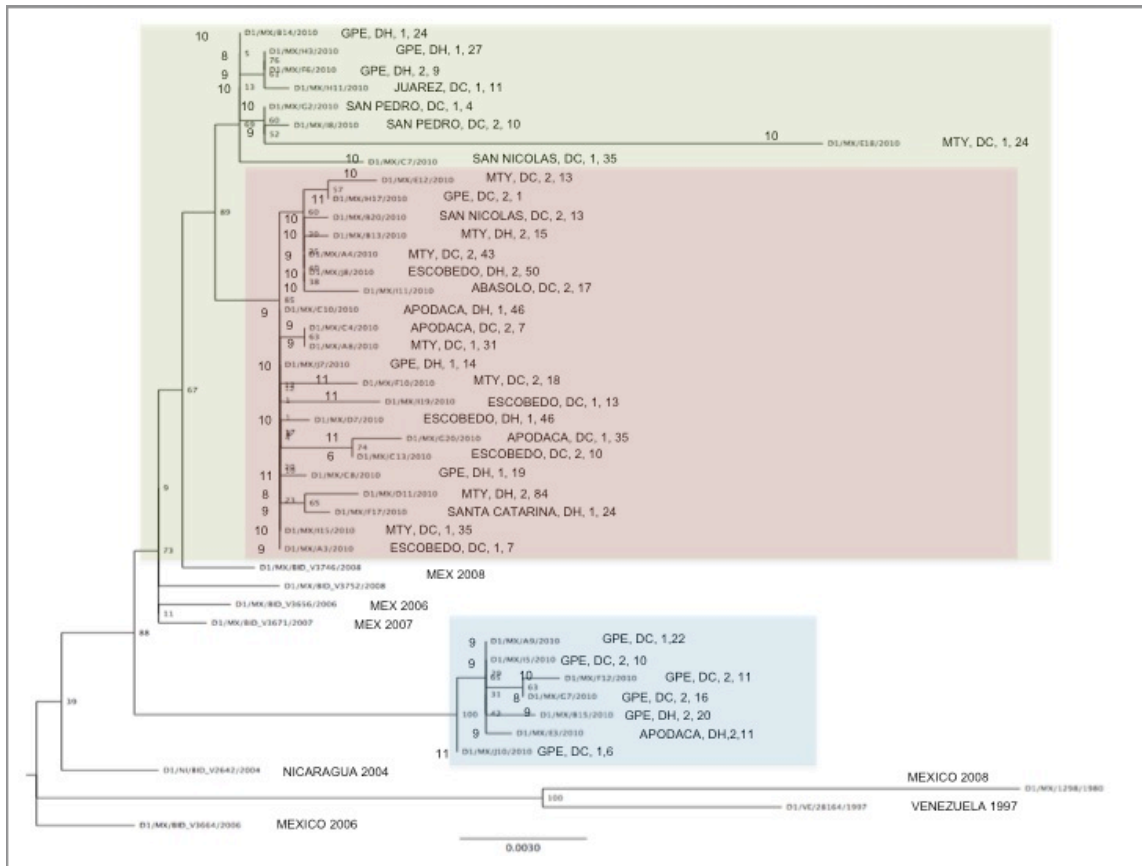


Figura 18.- Árbol filogenético mostrando comparación con aislados de Latinoamérica.

Como resultado del análisis filogenético (figura 18) se encontró que existieron 3 diferentes linajes de DENV-1 durante el 2010 los cuales co-circularon en el área metropolitana de Nuevo León y municipios aledaños tal como se muestra en la figura 19. Se trató de correlacionar los linajes encontrados con el mes de aislamiento, la ubicación geográfica, la presentación clínica así como edad y sexo del paciente (tabla 12). No observando ningún patrón específico, en los primeros 2 linajes, mientras que el

linaje 3 se observó geográficamente localizado en el municipio de Guadalupe mayoritariamente.

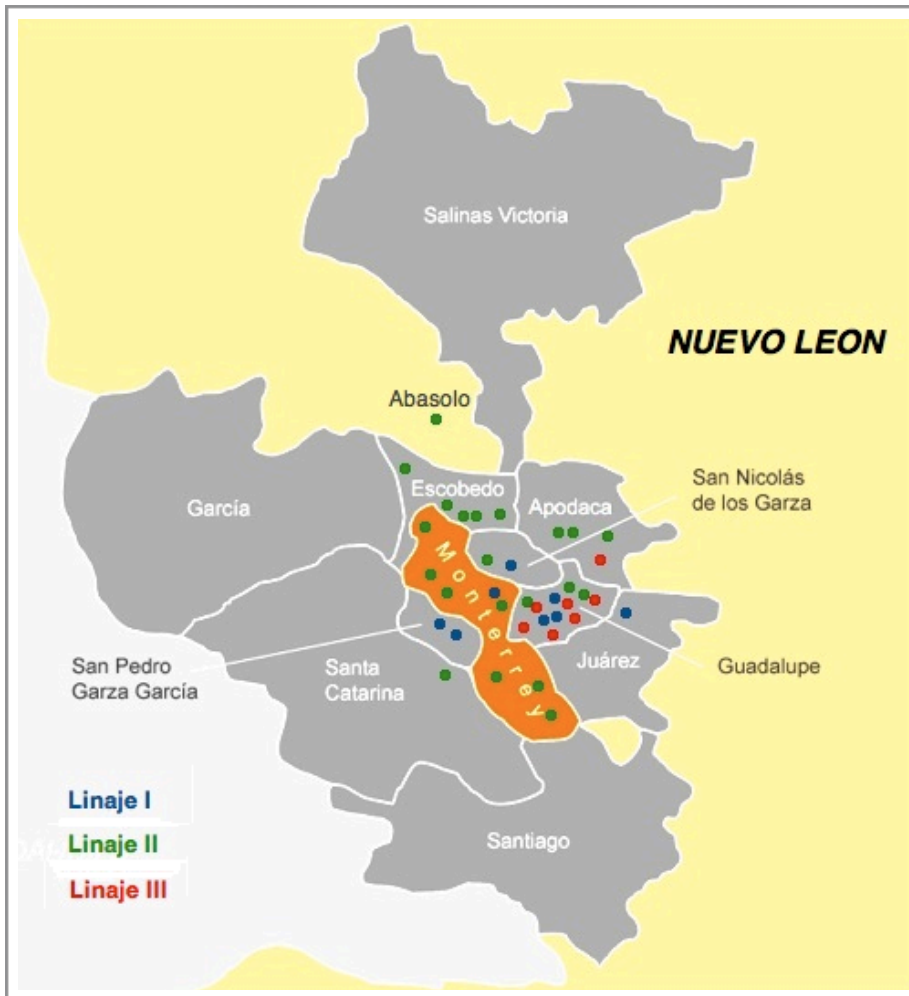


Figura 19.- Ubicación geográfica de los linajes encontrados en Nuevo León

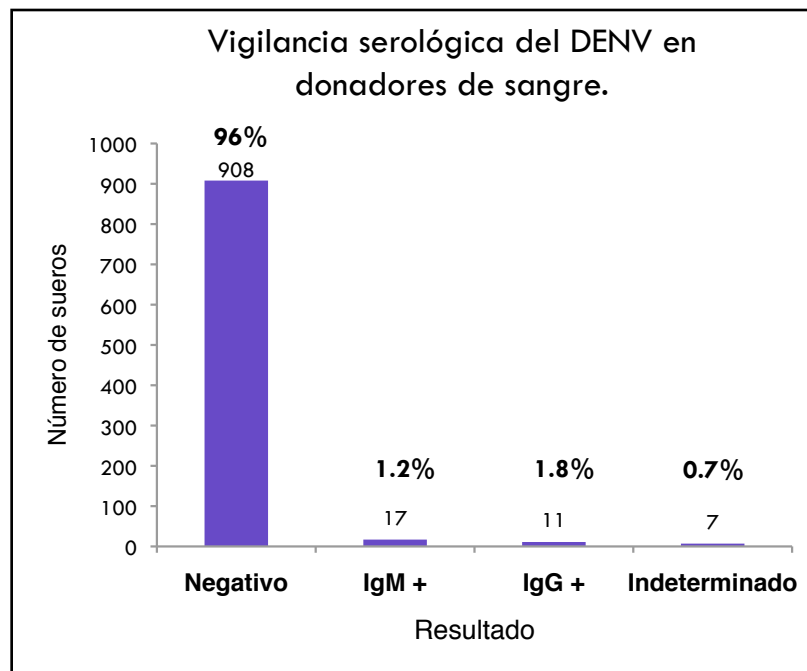
4.- Vigilancia serológica

También, como parte de este trabajo se buscó la presencia de anticuerpos del tipo IgG e IgM para la identificación de infecciones asintomáticas por el virus del Dengue.

De las 1002 muestras colectadas durante el periodo del 29 de Septiembre del 2010 al 2 de Mayo del 2011, se descartaron 59 sueros por la mala calidad de la muestra (lipemicos, hemolisados o contaminados) por lo que se analizaron 943 sueros provenientes de donadores de sangre.

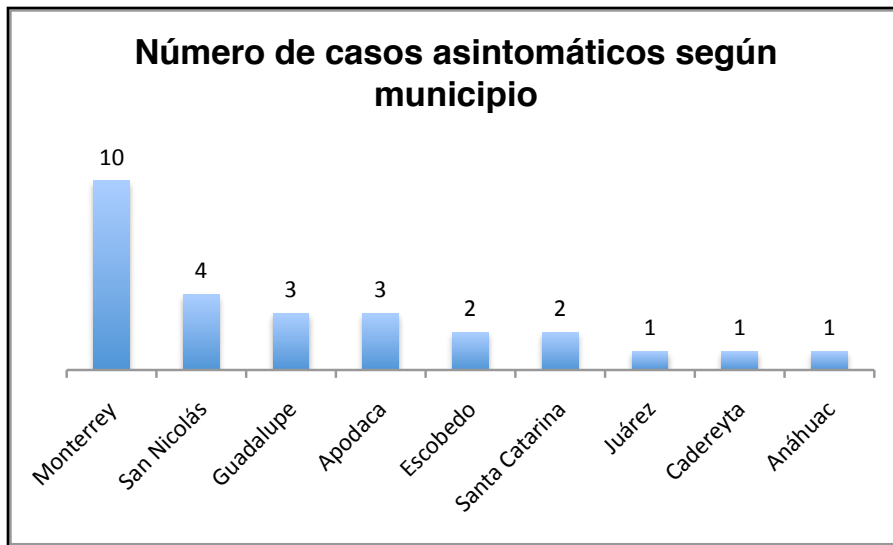
Como resultado encontramos que el 96% (n=908) de las muestras resultaron negativas o no reactivas para la presencia de anticuerpos contra el DENV, mientras que el 3% fue reactivo para infecciones por dengue, de las cuales el 1.8% (n= 17) resultaron IgG positivas, mientras que 1.2% (n=11) correspondieron a IgM positivas. Además, se detectó un 0.8% de muestras indeterminadas para IgG (n=6) e IgM (n=1).

Gráfica 5.- Vigilancia serológica del DENV en donadores de sangre.



En cuanto a la información epidemiológica de las 28 muestras que resultaron reactivas para DENV, las edades de los donadores se encontraron en el rango de 19 a 61 años, con una proporción de género de 71% masculino (n=20) y 29% femenino (n=8). Los municipios de cuales provinieron las muestras (residencia de los donadores) de mayor a menor proporción fueron: Monterrey, San Nicolás, Guadalupe, Apodaca, Escobedo, Santa Catarina, San Pedro, Juárez, Cadereyta y Anáhuac (Gráfica 6).

Gráfica 6.- Número de casos asintomáticos según municipio.



VIII.- DISCUSIÓN

La Secretaria de Salud reportó la circulación de los cuatro serotipos del virus del Dengue durante el 2010 en México. También en otros países latinoamericanos se han reportado los 4 serotipos, lo que favorece la incidencia de más casos de infecciones secundarias, y en consecuencia, un aumento del riesgo de DH/SSD.

Por otro lado, se ha reportado que cada 3 a 4 años una reducción de la incidencia es inmediatamente seguida por 2 ó 3 años de aumento del número registrado de pacientes [6]. Este mismo patrón se refleja en los casos reportados en los panoramas epidemiológicos de dengue del 2007 al 2010 por la SSA en Nuevo León, ya que se observó que el número de casos totales reportados en 2007 fueron 3164, posteriormente este número disminuye a ~850 y ~530 casos en 2008 y 2009 respectivamente, presentándose un incremento en el número de casos en 2010 con ~2200 casos, sin embargo, es necesario seguir analizando estos datos ya que hasta lo observado en 2010 no supera el pico de incidencia observado en el ciclo previo.

Cabe mencionar que desde el 2008 y hasta el cierre del 2010 se identificó a los serotipos 1 (mayoritariamente) y 2 del virus como los responsables de las infecciones en Nuevo León. Esto es importante ya que la secuencia de infección DENV-1-DENV-2 ha sido incriminada con mayor frecuencia a las epidemias DH/SSD. Además se ha reportado que en infecciones primarias por DENV-1 la enfermedad es más severa al compararse con infecciones primarias ocasionadas por el DENV-2 o DENV-4 [16].

Lo anterior podría agravar las epidemias que se presentan en el estado de Nuevo León pero no solamente en este estado, ya que la Secretaria de Salud reporta que después de los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Durango, Michoacán, Nayarit, Sinaloa, Sonora donde el 100% de sus casos serotipificables son ocasionados por DENV-1, se encuentran con >95 % casos DENV-1 y <5 % por DENV-2, DENV-3 los estados de Nuevo León, Guerrero, Jalisco, Mexico, Morelos y Puebla seguidos de San

Luis Potosí donde el 88% de sus casos son atribuidos a DENV-1 y el 12% a DENV-4, mientras que Veracruz, Yucatán y Campeche presentan un 60% de sus casos por DENV-1 y solo 40% por DENV-2, por lo que en general gran parte del territorio nacional se encuentra en riesgo de sufrir epidemias más severas.

Desde hace varios años, con el uso del análisis filogenético se ha tratado de relacionar no solo a los serotipos sino también a los genotipos como los causantes de brotes así como con la severidad de estos, aunque no ha sido del todo posible. Existen indicios en cuanto a la incriminación de serotipos del virus con infecciones primarias más severas [16]. Además es ampliamente reconocido que el genotipo del sureste asiático DENV-2 esta asociado a la presentación severa de la enfermedad al menos en América [52].

En cuanto a DENV-1 a partir del estudio realizado por Goncalvez y colaboradores en 2002, se concluyó que el genotipo de América/África (V) tiene el potencial de causar las formas severas de la enfermedad (DH/SSD), dicho genotipo se ha extendido a otros países o regiones geográficas en la última década. Por lo que, este genotipo se considera de alto impacto epidemiológico en comparación con el genotipo selvático (III) [45]. Es evidente a partir de estos resultados que un estudio más completo y sistemático de las muestras de serotipo 1 es necesario antes de establecer una relación entre determinados genotipos y la virulencia de estos virus.

Teniendo en cuenta lo anterior, en Nuevo León durante el 2010 se aislaron 584 genomas virales de los cuales 572 pertenecieron al serotipo 1 del virus del Dengue.

Lo anterior aunado a la información epidemiológica antes descrita en donde varios estados se encuentran en la misma situación que Nuevo León nos da una idea de que lo encontrado en este trabajo puede ser representativo y alusivo de lo que se encuentra en estos estados. Es importante mencionar en este punto que la información aquí obtenida representa un sesgo al solo incluir los genomas (casos) que resultaron en enfermedad con resultado clásico (DC) o severo (DH) dejando sin muestreo aquellos casos de

enfermedad subclínica y asintomática, destacando que la mayoría de las infecciones por dengue cursan asintomáticas [21].

En este trabajo se llevó a cabo el análisis filogenético de 36 genomas del DENV aislados de Nuevo León durante el brote que se presentó en 2010. Los genomas aislados provenían de 24 casos de dengue clásico y 12 de dengue hemorrágico. Los cuales fueron aisladas mayoritariamente de municipios del área metropolitana de Nuevo León y municipios aledaños (Escobedo, Monterrey, Apodaca, Guadalupe, San Nicolás, San Pedro, Santa Catarina, Juárez y Abasolo). El análisis filogenético mostró que estos pertenecen al genotipo V América-África, ya que se utilizaron secuencias de referencia representativas de los genotipos I Asia, II Tailandia, IV Pacífico Sur y V América-África (tabla 13). Además de lo anterior como parte del análisis filogenético se generó un segundo árbol filogenético donde se incluyeron secuencias aisladas en México en años previos así como de Latinoamérica (Nicaragua, Venezuela) encontrando 3 linajes diferentes de DENV-1 co-circulando en Nuevo León durante el 2010. Un linaje independiente y bien definido compuesto por 7 aislados el cual se segregó con un valor de bootstrap de 100, mientras que otro linaje compuesto de 8 aislados se encontró más cercanamente relacionado con cepas aisladas de México en 2008, el cual contiene un linaje anidado que es distinto, compuesto por 21 aislados. Cabe mencionar que el aislado identificado como E18 en nuestro análisis puede excluirse debido a la anómala longitud de la rama en la que se ubicó [58].

Lo poco que entendemos hasta hoy de este virus, se ha adquirido indirectamente por la asociación de grupos evolutivos de cepas virales con sus presentaciones clínicas y epidemiológicas. En este trabajo, se trató de asociar los linajes identificados con la información epidemiológica (diagnóstico clínico, el género y la edad del paciente, localidad de aislamiento y mes de aislamiento) no encontrando una relación clara entre estos. Al respecto, es importante resaltar la siguiente información: los casos del linaje asociado a aislados del 2008, así como el anidado a este, mostraron un amplio espectro

clínico en los pacientes de los cuales fueron aislados, demostrando así la capacidad del genotipo V de producir dengue clásico y dengue hemorrágico lo que ya había sido reportado previamente [59], en cuanto a su procedencia, no se encontró un patrón geográfico específico sino que se observaron distribuidas en toda el área metropolitana así como en los municipios de Abasolo y Juárez, N.L. (Figura 14), en cuanto al mes de aislamiento estos aislados correspondieron a los meses de Agosto a Noviembre del 2010, no mostrando ningún patrón específico. Mientras que en cuanto al género y edad de los pacientes tampoco se encontró ninguna asociación. Por otro lado en cuanto al linaje bien diferenciado (bootstrap=100), este mostró una tendencia de localización geográfica en el municipio de Guadalupe al provenir de este municipio 6 de los 7 aislamientos que conforman el linaje. Mientras que en cuanto a la presentación clínica, estos aislados correspondían mayoritariamente a DC, sin embargo, fue capaz de producir DH, cabe mencionar que no hubo asociación en cuanto a edad y género del paciente o mes del aislamiento al corresponder a los meses de Agosto a Noviembre.

La co-circulación de linajes dentro de los genotipos que comprenden al DENV-1 ya ha sido reportada previamente en aislados provenientes de América latina.

A manera de comparación, en 2004 se analizaron 84 aislados de DENV-1 colectados durante el periodo de 1995-2001 en Brasil, los cuales provinieron de pacientes que presentaron DC, se identificaron 19 variantes, dichas variantes mediante el análisis filogenético de ML indicó que diferentes subtipos de un solo genotipo del DENV-1 co-circularon en Brazil durante dicho periodo. Sugiriendo que dicho genotipo estaba cercanamente relacionado con cepas de reportadas dentro del genotipo I reportado por Rico-Hesse en 1990. Por otro lado, utilizando diferentes análisis (split decomposition analysis) encontraron un primer grupo el cual incluía 6 secuencias brasileñas y 3 del caribe, pertenecientes al genotipo I y un segundo grupo en el cual se encontraron secuencias aisladas de Sao Paulo que presumiblemente provenían de un solo brote sin embargo, mencionan que el diagrama de red realizado no mostró ninguna evidencia del

agrupamiento de secuencias de acuerdo al país, región y fechas. Sin embargo como limitaciones de este trabajo mencionan que la secuencia de unión de los genes E y NS1 empleada no brinda suficiente información [60].

La co-circulación de diferentes linajes dentro del genotipo V al cual corresponden los aislados de Nuevo León también ha sido reportada previamente. En un estudio realizado en Venezuela se genotipificaron 43 cepas de DENV-1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007. El análisis filogenético determinó que los aislados virales se agruparon dentro del genotipo V, junto con virus detectados en Argentina, Brasil, Nicaragua, Guyana Francesa y Puerto Rico además encontraron el agrupamiento de los aislados aragüeños en dos linajes (clados) que incluyen cepas aisladas en períodos de tiempo diferentes, lo que fue sugestivo de un probable reemplazo del linaje de los aislados virales circulantes en 1997 y 1998 por el linaje que agrupa todos los virus circulantes entre 2004 y 2007, además de algunos obtenidos en 1998 y 1999 [59]. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio ellos incluyeron aislados provenientes de un periodo de 10 años, por lo que pudieron obtener mayor información misma que los llevó a proponer el probable remplazo de clados, por otro lado resalta la importancia de lo encontrado en Nuevo León ya que se encontraron 3 linajes usando aislamientos de solo un año, por lo que el monitoreo y análisis filogenético de aislados de DENV-1 de Nuevo León debe continuar ya que como se ha mostrado previamente constituye una valiosa herramienta para entender patrones y procesos epidemiológicos del dengue.

Siguiendo con lo reportado en América Latina, usando la secuencia completa para el análisis filogenético de aislados de DENV-1 de 1999-2000 provenientes de Buenos Aires, Argentina se encontró que se dividieron en dos clusters dentro del genotipo V (Americano). El clado I se encontró filogenéticamente relacionado con muestras brasileñas mientras que el clado II con muestras de Paraguay y el Noreste de Argentina. Mientras que como parte del análisis que se llevó a cabo en nuestro trabajo uno de los

linajes identificados (linaje 1) se relacionó filogenéticamente con cepas aisladas de México en 2008 (Figura13).

Recientemente (2010) en Colombia se realizó un estudio similar para reconstruir la historia filogenética del virus en este país, empleando para ello la región carboxilo terminal del gen de envoltura de 74 aislados de DENV-1 colectados entre 1978 y 2007, los investigadores reportaron que como esperaban todas las cepas junto con aquellas de Brasil, Paraguay, Argentina y de diferentes Islas del Caribe, corresponden al ya descrito genotipo V mostrando dos diferentes linajes con base en la distribución cladística, además reportaron que uno de sus aislados pertenecía al genotipo I (Asia), la cual representó para ellos una sola introducción que no se propagó. Lo anterior evidencia la presencia del genotipo V en Latinoamérica en aislados recientes, además también muestra la presencia de linajes dentro del genotipo [44].

Con respecto a lo descrito para DENV-1 en México, se reportó en 2006 el análisis de ML de 6 aislados de Mérida de DENV-1 utilizando la región prM, encontrando que los 6 aislados se agruparon juntos, estando mas relacionados con aislados de Guyana 89 y Brasil 90 y más distantemente con aislados de Filipinas 84 y Jamaica 77, además encontraron que 2 de sus aislados de 1980 fueron idénticos [61], sin embargo ellos no describen el genotipo al cual pertenecen los aislados empleados en el estudio.

Carrillo-Valenzo *et al.* (2010) analizaron usando ML el gen de envoltura completo de 23 aislados de DENV-1 provenientes de los estados de Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Jalisco, Querétaro, Michoacán, Morelos, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo encontrando que estos cayeron dentro del genotipo III del virus, el cual mencionan esta distribuido en toda Latinoamérica, con respecto a esto se ha reportado que los virus más cosmopolitas son aquellos asignados al genotipo III, el cual incluye virus de Asia (incluyendo Tailandia), África y Latinoamérica [36]. Además reportaron que aunque solo se observa un genotipo en México, el análisis filogenético que

realizaron reveló al menos tres introducciones del genotipo III, lo que se evidenció por la presencia de tres linajes filogenéticamente diferentes (definen las introducciones como grupos filogenéticamente distintos de virus con altos valores de probabilidad). También, realizaron un análisis de tiempo de ancestro común, con el cual concluyen que hubo poca o casi nula co-circulación de los linajes virales asociados con las tres introducciones. El grupo de virus asociados con la primera introducción data de 1973-1978, la cual circuló al menos hasta 1986. Los virus asociados con la segunda introducción que sucedió entre 1985-1992, sugiriendo una introducción más reciente a México. Dichos virus circularon hasta 1995. Por último, la tercera introducción tuvo una fecha de ancestro común de 1997-2001 y circuló hasta el 2007. Además, se menciona que este último linaje circuló en casi todos los estados y parece que se ha distribuido mas ampliamente a Centroamérica, ya que aislados de El Salvador y Nicaragua que están cercanamente relacionados con los de México [58]. Estos autores mencionan que debido a que en 2007 fue la fecha de la muestra más reciente, este linaje probablemente circule en la actualidad, lo cual se refuta con los resultados de este estudio en el que no se encontró el genotipo III encontrando en cambio el genotipo V, sin embargo, este genotipo como ya se mencionó previamente, ha sido descrito en otros países latinoamericanos, cabe mencionar que este estudio solo consistió de aislados de Nuevo León durante el brote presentado en 2010, además es probable que en el lapso de 3 años entre estos dos estudios, pudo haberse presentado una introducción del genotipo V (América-África) la cual posiblemente desplazó al genotipo III reportado hasta el 2007 por Carrillo-Valenzo.

Por otro lado, el alto número de casos asintomáticos, la viremia asintomática en estados tempranos de infección y la alta transmisión viral durante los brotes son los factores principales que pueden contribuir a que un número sustancial de donadores de sangre sean virémicos al momento de la donación. A su vez, la eficiencia de la transmisión depende de una combinación de factores: la cantidad y estabilidad de los virus, el volumen de sangre virémica transfundida y el estado inmune del receptor [5].

Debido a la alta endemicidad mundial para el dengue, hay una creciente probabilidad de que los donadores de sangre en estos países estén infectados o expuestos a la infección. Por lo que en poblaciones como estas la exclusión con base en los síntomas falla en la identificación con el riesgo de coleccionar sangre de donadores virémicos asintomáticos, estudios sugieren que hay al menos de 1 a 2 días de infectividad antes del desarrollo de los síntomas, reportando que los niveles de viremia durante la fase de incubación pueden exceder los 10^6 viriones por mL.

Se ha reportado que el dengue puede ser transmitido por transfusión de sangre y transplante de órganos, evidencia de lo anterior es la reportada en 2008 en Singapur, un país en el cual esta enfermedad es endémica, se reportó una transfusión sanguínea que estuvo asociada con infecciones de dengue en los receptores de los productos sanguíneos derivados de la donación [62], mientras que para el transplante de órganos se reportó la transmisión durante un transplante de médula ósea durante una epidemia de Dengue en Puerto Rico en 1994. El receptor desarrolló fiebre 4 días después del transplante y subsecuentemente murió. El donador desarrolló fiebre y dolor de cabeza 2 días después de que la médula se colectó [5].

Varios estudios han mostrado que la presencia de infecciones asintomáticas o subclínicas pueden estar en el rango de 0.77 a 87% dependiendo de la población que se estudie. Además se estima que por cada caso sintomático puede haber 6.7 casos que son asintomáticos [1].

En un estudio de 329 voluntarios sanos de una provincia de Tailandia con una tasa alta de infección de dengue, el 8.8% resultó positivo para IgM anti-DENV. En un estudio en Indonesia, de 785 voluntarios durante 2 años se detectaron 8 infecciones asintomáticas. En Colombia se aisló el virus en 215 de 3189 personas (6.7%), los cuales fueron asintomáticos en su mayoría. En Puerto Rico se encontró un 0.07% de viremia de 16,521 donaciones de sangre. En muestras de donadores de sangre asintomáticos en Honduras y

Brasil se encontraron 0.3% de 2,994 muestras y 0.06% de 4,858 muestras respectivamente [5].

En cuanto a lo anterior, en México el cual también es una zona endémica para dengue, en 2003 se reportó una prevalencia de punto para infecciones por dengue de 32.8% encontrada en (433 y 245 al inicio del estudio y siete meses después, respectivamente) habitantes del estado de Colima, Colima, México, los autores mencionan que estos resultados podría subestimar la prevalencia real debido a la baja sensibilidad de la prueba ICR para IgG, por otro lado ellos reportaron que doce individuos resultaron con infección reciente (incidencia de 1.77%; IC 95%: 0.9-3.1%) [12].

Mientras que en 2008, se determinó la seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes de 275 estudiantes Universitarios de Tabasco, México, los cuales refirieron no haber padecido dengue o ignorarlo, encontrando que la prevalencia de IgG contra el dengue fue de 9.1% (25/275), sin embargo, 6 de estos reconocieron posteriormente antecedentes de dengue [63].

Posteriormente, en 2009 se reportó con base en un estudio realizado en la misma área endémica reportada en el presente estudio se analizaron 800 donadores de sangre cuyas donaciones fueron de Diciembre de 2006 a 2007, se reportó que el 59% de las donaciones fueron reactivas para IgG anti-DENV y 2% para IgM anti-DENV, lo que evidencia infección secundaria y primaria respectivamente [64]

En este trabajo se colectaron 1002 muestras de suero de donadores de sangre durante el periodo comprendido del 29 de Septiembre del 2010 al 2 de Mayo del 2011, de los cuales se descartaron 59 muestras debido la mala calidad de las muestras (lipémicas, hemolisadas o contaminadas), analizando un total de 943 sueros obteniendo que el 3% de las muestras fue reactivo para infecciones por dengue, de las cuales el 1.8% (n= 17) resultaron IgG positivas o infecciones secundarias activas mientras que 1.2% (n=11)

correspondieron a IgM positivas o infecciones primarias activas. Detectando que un 0.8% de las muestras resultaron indeterminadas para IgG e IgM. Lo encontrado en este trabajo difiere con lo reportado en 2009 para esta misma zona endémica por Rodríguez-Rodríguez lo que puede deberse a la diferencia en los métodos empleados en el análisis de las muestras sobretodo con lo concerniente a la identificación de IgG anti-DENV donde en este trabajo se uso un estuche diagnostico comercial (PanBio Dengue IgG-capture ELISA) el cual detecta infecciones secundarias activas, mientras que el empleado por Rodríguez-Rodríguez (PanBio Dengue IgG Indirect ELISA) determina infecciones secundarias por DENV. Por otro lado, en cuanto a la prevalencia de IgM anti-DENV se observó una proporción similar a la reportada previamente de 2% en 2009 con respecto al 1.2% encontrado en este trabajo.

En suma, aunque el screening de infección por DENV de los donadores de sangre podría resultar costoso, su uso para garantizar la seguridad de los receptores de derivados de la donación de sangre, debería considerarse en relación costo-beneficio al tratarse de zonas endémicas como la estudiada en este trabajo.

IX.- CONCLUSIONES

La caracterización genética del DENV es un parámetro de gran importancia para entender los patrones epidémicos de distribución viral.

La relación filogenética de las 36 cepas aisladas de DENV-1 durante el 2010 y analizadas en este estudio demuestra que pertenecen al genotipo V América-África. Además se observó que estas se agruparon 3 diferentes linajes de DENV-1 que co-circularon durante el 2010.

El análisis de los linajes que co-circularon en 2010, utilizando la información epidemiológica de los casos, demostró que el linaje 1 comprende 8 aislados los cuales se relacionaron con secuencias de México del 2008 lo anterior es soportado por un valor de bootstrap de 67, anidado a este linaje se encontró un linaje número dos el cual comprendió la mayoría de los aislados (21) con un valor de soporte de 89 y por último se encontró un tercer linaje el cual esta soportado por un bootstrap de 100 el cual incluyo 9 aislados, los cuales provenían de casos mayoritariamente de DC aislados del municipio de Guadalupe, N.L.

En conclusión, el análisis filogenético realizado en este estudio fue determinante para conocer la variabilidad genética y el impacto epidemiológico de los virus circulantes en Nuevo León en el brote que se presentó en 2010. En consecuencia, los programas epidemiológicos deben incluir no solo diagnóstico viral, sino también vigilancia genotípica viral.

Además se identificó un 3% de prevalencia de infecciones asintomáticas de DENV por medio de vigilancia serológica en un grupo de 943 sujetos sanos habitantes de Nuevo León. Destacando que de estas el 1.2% correspondió a infecciones primarias activas (IgM anti-DENV) y el 1.8% a infecciones secundarias activas (IgG anti-DENV).

X.- PERSPECTIVAS





Realizar el análisis filogenético de los DENV-2 y 4 colectados durante el brote que tuvo lugar en 2010 lo que completará la identificación de las variantes genéticas que se presentaron en Nuevo León en dicho año.

Implementar el uso de la línea celular C6/36 para la amplificación de los DENV presentes en el suero de los pacientes.

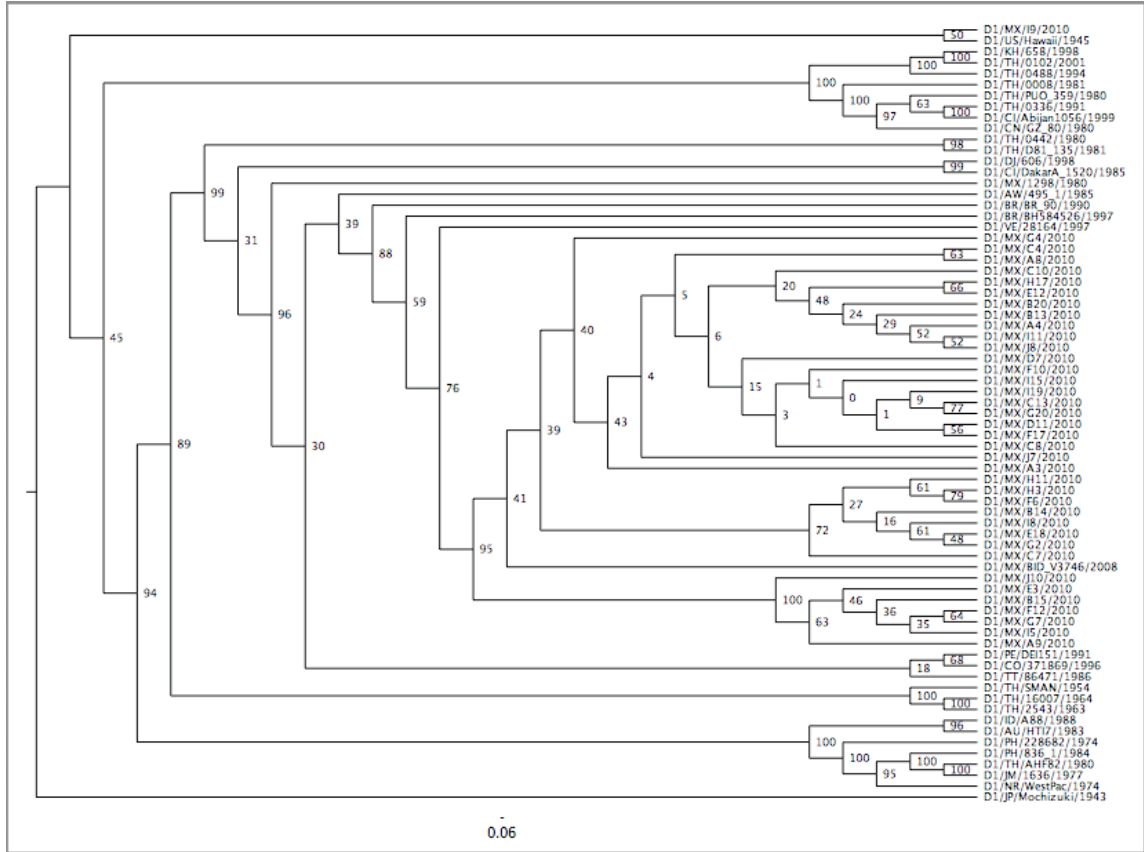
Analizar otras regiones del genoma (C-prM, NS1) o el genoma completo del DENV para determinar cual proporciona mayor información evolutiva.

XI.- ANEXOS

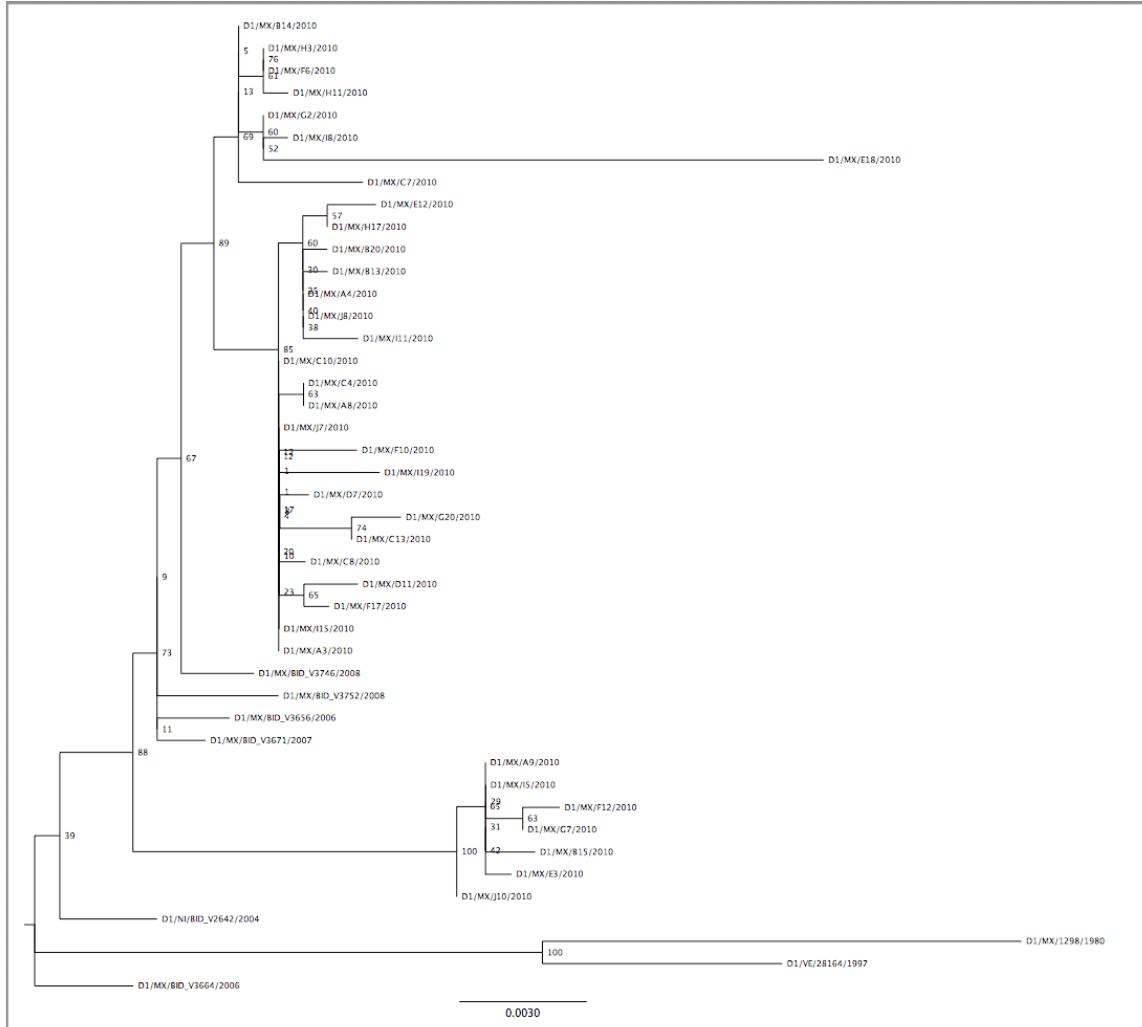
A) Consentimiento informado de los donadores

 UANL UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN	 FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO
CARTA DE CONSENTIMIENTO	
ESTUDIO CLÍNICO-MOLECULAR DE INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE EN UN HOSPITAL DE ENSEÑANZA DEL NORESTE DE MEXICO en 2009 y 2010	
<p>En el estado de Nuevo León, México existen las condiciones ambientales y los vectores necesarios para la transmisión de infecciones por Flavivirus particularmente el dengue. Para identificar a los agentes causales es necesario realizar estudios moleculares en muestras de suero para determinación de material genético y anticuerpos específicos de tal manera que nos facilite el diagnóstico y nos permita un tratamiento oportuno.</p>	
Procedimiento del estudio	
<p>Durante la estancia en el hospital se solicitara al personal de enfermería toma de 2 muestras de sangre para identificación del virus. La toma de la muestra consiste en una punción percutánea con aguja en su brazo. No será necesaria la interrupción de los tratamientos que esté tomando en ese momento.</p>	
Riesgos asociados al estudio	
<p>Los riesgos de esta toma de muestra serán reportados por el médico a cargo y consisten principalmente en complicaciones locales en el sitio de punción, principalmente formación de hematomas, sangrado o infección del sitio.</p>	
Beneficios que aportara el estudio al paciente	
<p>Inmediatos: Se realizaran pruebas de laboratorio para este virus de manera gratuita.</p>	
<p>Mediatos: De acuerdo a los resultados, el médico podría definir el tratamiento y establecer un pronóstico.</p>	
<p>Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además entiendo que estoy en libertad de retirarme en el momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectara en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.</p>	
<p>Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violara mi privacidad.</p>	
<p>Además el grupo de investigación estará en disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación.</p>	
_____ NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE	_____ NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO
_____ TESTIGO	_____ TESTIGO
<p>SERVICIO DE INFECTOLOGÍA Av. Francisco I. Madero Pte. S/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, Nuevo León, México Tel. (81) 8348 5013 Conn. (81) 8389 1111 Exts. 3297 y 2405</p>	
 INFECTOLOGÍA HOSPITAL UNIVERSITARIO	
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</p>  <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">COMITÉ DE ÉTICA COMITÉ DE INVESTIGACIÓN</p>	

B) Árbol filogenético mostrando contexto genotípico.



C) Árbol filogenético mostrando comparación con aislados de Latinoamérica.



XII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Lavezzo, L.C., et al., *Arboviruses in blood donors: a study in the Amazon region and in a small city with a dengue outbreak*. *Transfus Med*, 2010. **20**(4): p. 278-9.
2. Weaver, S.C. and W.K. Reisen, *Present and future arboviral threats*. *Antiviral Res*, 2010. **85**(2): p. 328-45.
3. Kuno, G., et al., *Phylogeny of the genus Flavivirus*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 73-83.
4. Clyde, K., J.L. Kyle, and E. Harris, *Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis*. *J Virol*, 2006. **80**(23): p. 11418-31.
5. Teo, D., L.C. Ng, and S. Lam, *Is dengue a threat to the blood supply?* *Transfus Med*, 2009. **19**(2): p. 66-77.
6. Torres, J.R. and J. Castro, *The health and economic impact of dengue in Latin America*. *Cad Saude Publica*, 2007. **23 Suppl 1**: p. S23-31.
7. Huang, J.H., et al., *Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study*. *Am J Trop Med Hyg*, 2007. **77**(5): p. 903-9.
8. Guzman, A. and R.E. Isturiz, *Update on the global spread of dengue*. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. **36 Suppl 1**: p. S40-2.
9. Gubler, D.J., *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. *Clin Microbiol Rev*, 1998. **11**(3): p. 480-96.
10. WHO, W.H.O., *DENGUE, Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. 2009.
11. Kukreti, H., et al., *Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007*. *Virol J*, 2009. **6**: p. 1.
12. Espinoza-Gomez, F., et al., *[Interepidemic transmission of dengue in the city of Colima, Mexico]*. *Salud Publica Mex*, 2003. **45**(5): p. 365-70.
13. Cann, A.J., *Principles of Molecular Virology*. 4th ed. 2005: Elsevier Academic Press.
14. Calisher, C.H. and E.A. Gould, *Taxonomy of the Virus Family Flaviviridae*, in *Advances in VIRUS RESEARCH, The Flaviviruses: Structure, Replication, and Evolution*, F.A.M. Karl Maramorosch, Aaron J. Shatkin, Editor. 2003, Elsevier Academic Press.
15. Endy, T.P., S.C. Weaver, and K.A. Hanley, *Dengue Virus: Past, Present and Future*, in *Frontiers in Dengue Virus Research*, K.A. Hanley and S.C. Weaver, Editors. 2010, Caister Academic Press: Norfolk, UK.
16. Murrell, S., S.C. Wu, and M. Butler, *Review of dengue virus and the development of a vaccine*. *Biotechnol Adv*, 2011. **29**(2): p. 239-47.

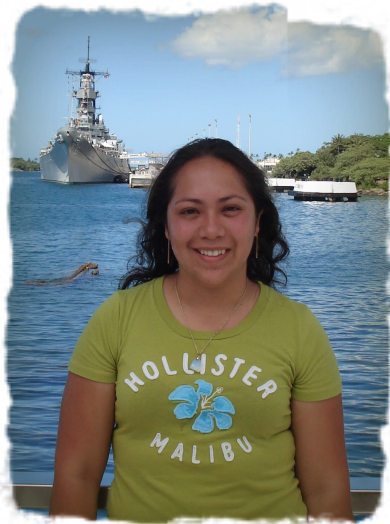
17. Weaver, S.C. and N. Vasilakis, *Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(4): p. 523-40.
18. Ross, T.M., *Dengue virus*. Clin Lab Med, 2010. **30**(1): p. 149-60.
19. Barrero, P.R. and A.S. Mistchenko, *Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina*. Virus Res, 2004. **101**(2): p. 135-45.
20. Rossi, S.L., T.M. Ross, and J.D. Evans, *West Nile virus*. Clin Lab Med, 2010. **30**(1): p. 47-65.
21. Kyle, J.L. and E. Harris, *Global spread and persistence of dengue*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 71-92.
22. Badii, M.H., J.Landeros, E.Cernay, J.L. Abreu, *Bionomics and epidemiology of Dengue*. International Journal of Good Conscience, 2007: p. 286-297.
23. Briseno-Garcia, B., et al., *Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico*. Emerg Infect Dis, 1996. **2**(2): p. 133-5.
24. Araujo, J.M., et al., *Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(3): p. 526-9.
25. Gurugama, P., et al., *Dengue viral infections*. Indian J Dermatol, 2010. **55**(1): p. 68-78.
26. CENA VECE. *Situación de Dengue en México*. 2011 21/10/2009 [cited 2011 Septiembre].
27. Holmes, E.C., *RNA virus genomics: a world of possibilities*. J Clin Invest, 2009. **119**(9): p. 2488-95.
28. Falcon-Ledezma, J., G. Sánchez-Burgos, and J. Ramos-Castañeda, *Genética de las poblaciones virales y transmisión del dengue*. Salud Publica Mex, 2009. **51**: p. S403-S408.
29. IN DRE, *Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas. Información publicada a la semana 52 (Del 26 de Diciembre de 2010 al 1 de enero del 2011)*. 2010, Secretaria de Salud: México.
30. In DRE, *Panorama epidemiológico del dengue y dengue hemorrágico en entidades federativas. Información publicada a la semana 52 (Del 25 al 31 de Diciembre del 2005)*. 2005, Secretariade Salud: México.
31. In DRE, *Panorama epidemiológico del dengue y dengue hemorrágico en entidades federativas. Información publicada a la semana 52 (Del 24 al 30 de diciembre de 2006)*. 2006, Secretaria de Salud: México.

32. InDRE, *Panorama epidemiológico de dengue y dengue hemorrágico en entidades federativas. Información publicada a la semana 52 (Del 23 al 29 de Diciembre del 2007)*. 2007, SecretariadeSalud: México.
33. InDRE, *Panorama epidemiológico de dengue y dengue hemorrágico en entidades federativas. Información publicada a la semana 53 (Del 28 de Diciembre de 2008 al 3 de Enero del 2009)*. 2008, SecretariadeSalud: México.
34. InDRE, *Panorama epidemiológico de dengue y dengue hemorrágico en entidades federativas. Información publicada a la semana 52 (Del 27 de Diciembre al 2 de Enero del 2010)*. 2009, Secretaria de Salud: México.
35. Goddard, J., *Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance*. 2002: CRC Press. 472.
36. Zhang, C., et al., *Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15123-30.
37. Thai, K.T., et al., *Clinical, epidemiological and virological features of Dengue virus infections in Vietnamese patients presenting to primary care facilities with acute undifferentiated fever*. J Infect, 2010. **60**(3): p. 229-37.
38. Faingezicht, I. and M.a.L. Avila, *Diagnóstico clínico y de laboratorio del paciente con dengue*. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 1999. **34**: p. 33-41.
39. Shu, P.Y. and J.H. Huang, *Current advances in dengue diagnosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(4): p. 642-50.
40. Abdel-Hady El-Gilany, A., Sabri Hammad, *Clinico-epidemiological features of dengue fever in Saudi Arabia*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010: p. 220-223.
41. Navarrete-Espinosa, J., et al., *Clinical profile of dengue hemorrhagic fever cases in Mexico*. Salud Publica Mex, 2005. **47**(3): p. 193-200.
42. Hang, V.T., et al., *Diagnostic accuracy of NSI ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(1): p. e360.
43. Tricou, V., et al., *Comparison of two dengue NSI rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses*. BMC Infect Dis, 2010. **10**: p. 142.
44. Mendez, J.A., et al., *Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia*. Virol J, 2010. **7**: p. 226.
45. Rico-Hesse, R., *Microevolution and virulence of dengue viruses*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 315-41.

46. Anderson, J.R. and R. Rico-Hesse, *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, 2006. **75**(5): p. 886-92.
47. Bennett, S., *Evolutionary Dynamics of Dengue Virus*, in *Frontiers in Dengue Virus Research*, Kathryn A. Hanley and S.C. Weaver, Editors. 2010, Caister Academic Press: Norfolk, UK.
48. Mamani, E., et al., [Circulation of a different lineage of dengue virus serotype 2 American / Asian genotype in the Peruvian Amazon, 2010]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2011. **28**(1): p. 72-7.
49. Lorono-Pino, M.A., et al., *Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico*. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. **71**(4): p. 485-92.
50. Ramirez, A., et al., *Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: diversification, rates and population dynamics*. *Virol J*, 2010. **7**: p. 329.
51. Usme-Ciro, J.A., et al., *Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia*. *Virol J*, 2008. **5**: p. 101.
52. Rico-Hesse, R., et al., *Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand*. *Am J Trop Med Hyg*, 1998. **58**(1): p. 96-101.
53. Leitmeyer, K.C., et al., *Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis*. *J Virol*, 1999. **73**(6): p. 4738-47.
54. Cologna, R., P.M. Armstrong, and R. Rico-Hesse, *Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 853-9.
55. Armstrong, P.M. and R. Rico-Hesse, *Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 2003. **68**(5): p. 539-44.
56. Chao, D.Y., B.S. Davis, and G.J. Chang, *Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(2): p. 584-9.
57. Miller, M.A., W. Pfeiffer, and T. Schwartz, *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*.
58. Carrillo-Valenzo, E., et al., *Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement*. *Arch Virol*, 2010. **155**(9): p. 1401-12.
59. Camacho, D.E., et al., *Genotipificación de virus dengue tipo 1 circulantes en el estado Aragua durante el período 1997 – 2007*. *Salusonline*, 2008. **12**(1): p. 15.
60. Santos, C.L., et al., *Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004. **46**(3): p. 145-52.

61. Diaz, F.J., et al., *Genetic variation within the premembrane coding region of dengue viruses from the Yucatan peninsula of Mexico*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **67**(1): p. 93-101.
62. Tambyah, P.A., et al., *Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion*. N Engl J Med, 2008. **359**(14): p. 1526-7.
63. Sanchez-Burgos, G.G., et al., *[Prevalence of neutralizing antibodies to dengue virus serotypes in university students from Tabasco, Mexico]*. Salud Publica Mex, 2008. **50**(5): p. 362-6.
64. Rodriguez Rodriguez, D., et al., *Dengue virus antibodies in blood donors from an endemic area*. Transfus Med, 2009. **19**(3): p. 125-31.
65. Rambaut, A., 2002. SE-AL Sequence Alignment Editor, v2.0a11. University of Oxford, Oxford, UK. (Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).
66. Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. Syst. Biol. 57, 758–771.
67. Sitio Oficial del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Disponible en el sitio de red: www.cenave.gob.mx/dengue/. [Consultado el 16 de Agosto del 2011].
68. Portal del estado de Nuevo León. Disponible en el sitio de red: www.nl.gob.mx. [Consultado el 21 de Agosto del 2010].
69. Portal de la Comisión Nacional de Vigilancia Epidemiológica – SINAVE. Disponible en el sitio de red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/denguepano/dengue-2010.html>. [Consultada el 16 de Agosto del 2011].

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO



Selene Marysol García Luna

Candidato para el Grado de **Maestro en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DEL VIRUS DEL DENGUE Y SU ASOCIACIÓN CON LA DINÁMICA DE SU TRANSMISIÓN.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía: Datos Personales: Nacida en Monterrey, N.L. el 12 de Enero de 1988, hija de Marcelina Luna Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009 con mención honorífica, primer lugar en la generación.

Estancia de investigación de Mayo a Junio del 2011 en John A. Burns School of Medicine, Kaka'ako, University of Hawai'i at Manoa (651 Ilalo Street • Honolulu, Hawai'i 96813)