

Identificación del Arbovirus causante de brotes de enfermedad similar a Dengue en el estado de Carabobo, Venezuela

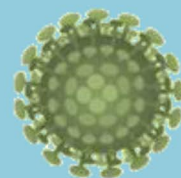
Autora: Lic. Emidalys Santana Acosta

**Tutores: Mayling Alvarez Vera, DrC
Esther María Mesa Castillo, MsC**

**Asesora: María G Guzmán Tirado, DrCs
Pedro A Martínez Rodríguez, DrC**

Tesis para optar por el Título de Máster en Virología

La Habana, 2018





Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Identificación de Arbovirus causante de brotes de enfermedad similar a Dengue en el estado de Carabobo, Venezuela

Autora: Lic. Emidalys Santana Acosta

**Tutores: Mayling Alvarez Vera, DrC
Esther María Mesa Castillo, MsC**

**Asesora: María G Guzmán Tirado, DrCs
Pedro A Martínez Rodríguez, DrC**

Tesis para optar por el Título de Máster en Virología

La Habana, 2018

*A mis hijos y mis padres que
son todo mi universo*

Agradecimientos

Primero que todo le doy gracias a Dios porque sin el nada de esto hubiese sido posible.

A mis hijos, mis padres, mi hermana y toda mi familia porque son mis guías y han estado a mi lado en cada paso que doy.

A mi tutora Esther María(María) solo yo te digo así con mucho cariño, ternura y amor eres mi hermana pequeña apoyándome en todo momento , mi profesora dándome tu mejor ejemplo a seguir tanto en lo personal como laboral siempre estaré agradecida contigo. Te quiero mucho mucho...

A Ariel por ser un ejemplo a seguir, permitirme aprender tanto de ti y brindarme todo tu apoyo incondicional al asumir esta difícil tarea. Te estaré eternamente agradecida.

A Mayling Álvarez por su confianza y sus valiosos consejos.

A María G. Guzmán Tirado por sus excelentes correcciones en la interpretación de los resultados, sin los cuales, no hubiera sido posible culminar este trabajo.

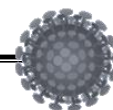
A mi amiga Giss que también estuvo batallando conmigo en todo momento no dejó que me rindiera nunca, gisi a pesar que ya no estés trabajando con nosotros siempre tendrás mi amistad y cariño y poder contar conmigo para lo que sea.

A todos mis amigos que están presente en este día tan importante para mí y a los compañeros del Departamento de Virología del Instituto “Pedro Kouri”, en especial a los del Laboratorio de Arbovirus, por su gran solidaridad, compañerismo y cooperación durante todo este tiempo.

Gracias a mi oponente Clarita que asumió esta tesis a pesar del poco tiempo, gracias por su comprensión.

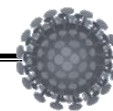
En fin, a todos los que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo solo les puedo decir:

Muchas Gracias!!!



RESUMEN

El dengue es hiperendémico en Venezuela, pero tras la introducción del virus de Chikungunya (VCHIK) y del Zika (VZIK) en el continente americano se dificulta el diagnóstico diferencial debido a la similitud en el cuadro clínico que ellos producen. Con el objetivo de identificar la causalidad de los virus del complejo dengue (VDEN), VCHIK y VZIK en brotes de enfermedad similar a dengue en el estado de Carabobo, Venezuela, se estudiaron 264 muestras de plasma de pacientes con diagnóstico de cuadro clínico similar a dengue en el período diciembre 2013 - febrero 2016. Mediante protocolo múltiple Trioplex rRT-PCR se determinó la presencia del ARN del VZIK, VCHIK y VDEN, mientras que el serotipo de estos últimos se identificó por el protocolo de PCR en tiempo real CDC VDEN1-4. En 181 pacientes (68.6 %) se confirmó la infección por al menos un arbovirus, detectándose según orden de frecuencia el VCHIK, VDEN y VZIK en 121 (66.9%), 50 (27.6%) y 10 (5.5%) pacientes; respectivamente. Además, se demostró la circulación simultánea del VDEN y VCHIK en el año 2014, no identificándose coinfecciones de los arbovirus estudiados. Los brotes del VDEN y VCHIK ocurrieron entre los meses de agosto y diciembre, con picos máximos en septiembre y octubre. Estos resultados además de confirmar la hiperendemicidad del VDEN en el estado de Carabobo de Venezuela, resaltan la importancia del uso de protocolos múltiples de biología molecular para el diagnóstico etiológico de los brotes de enfermedad por arbovirus sobre todo en aquellos países en los que circulan estacionalmente estos agentes.



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato -del inglés- Adenosine TriPhosphate

CDC: Centro para el control de enfermedades de los Estados Unidos -del inglés- Control Disease Center

CN: Control Negativo

CP: Control Positivo

Ct: Línea umbral -del inglés- Threshold Cycle

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos -del inglés - Food and Drug Administration

HSC: Muestra de control humano -del inglés- Human Sample Control

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

LA: Líquido amniótico

LCR: Líquido ceforraquídeo

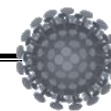
LNR: Laboratorio Nacional de Referencia

NDT: No detectable

NS: Proteína no estructural –del inglés- Non Structural

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud



ORF: Marco abierto de lectura –del inglés- Open Reading Frame

Proteína C: Proteína de cápside

Proteína E: Proteína de la envoltura

Proteína M: Proteína de membrana

PHEIC: Emergencia de salud pública de importancia internacional -del inglés- Public Health Emergency of International Concern

RE: Retículo endoplasmático

RP: Gen de la RNasa P

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real - del inglés- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SE: Semana Epidemiológica

SGB: Síndrome de *Guillain-Barré*

UTR: Regiones no codificantes –del inglés- Untranslated Regions

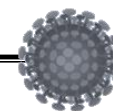
VCHK: Virus Chikungunya

VDEN: Virus Dengue

VFA: Virus de la Fiebre Amarilla

VNO: Virus del Nilo Occidental

VZIK: Virus del Zika

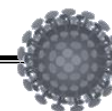


ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
General	4
Específicos.....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
DEFINICIÓN E HISTORIA DE ARBOVIRUS.....	5
Género Flavivirus	5
Género Alfavirus	6
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ARBOVIRUS	6
Género Flavivirus	6
Género Alfavirus	7
PROTEÍNAS VIRALES.....	8
Género Flavivirus	8
Género Alfavirus	10
PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS	13
Género Flavivirus	13
Género Alfavirus	13
CICLO REPLICATIVO	14
Género Flavivirus	14
Género Alfavirus	15
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	16
DIAGNÓSTICO DE LAS ARBOVIROSIS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	21
UNIVERSO DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA	21
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	23
MUESTRAS CLÍNICAS	25
EXTRACCIÓN DEL ARN	25
RT-PCR EN TIEMPO REAL	26
Cebadores y sondas	26
Mezcla de la reacción de RT-PCR en tiempo real	28
Controles de la RT-PCR en tiempo real.....	31
Proceso de amplificación y detección	32
Análisis e interpretación de los resultados	34
Validación de la corrida.....	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

CAPÍTULO I

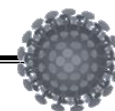
INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Con el término arbovirus se agrupan a más de 500 virus transmitidos por artrópodos de los que, hasta el momento, 150 pueden causar enfermedades al humano (1). Entre los que mayor impacto tienen en salud humana a nivel mundial están los virus del complejo dengue (VDEN), el virus del Zika (VZIK) y el virus Chikungunya (VCHIK). Los VDEN y el VZIK pertenecen a la misma familia y género (Familia: *Flaviviridae*, género *Flavivirus*), mientras que el VCHIK pertenece al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. La relevancia de estos agentes está dada, en el caso del VDEN, por la elevada morbilidad y mortalidad que produce. Tiene una amplia distribución en países tropicales y subtropicales siendo responsable de más de 390 millones de infecciones anuales (2). El VZIK adquirió importancia a finales del año 2015 luego de una inusual aparición de conglomerados de casos de microcefalia en recién nacidos y de desórdenes neurológicos (Síndrome de *Guillain Barré*) tras su introducción en Brasil. Fue por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a esta situación como una emergencia de salud pública de importancia internacional (PHEIC - del inglés- *Public Health Emergency of International Concern*) desde febrero hasta noviembre del 2016 (3). Finalmente, la infección por VCHIK además de producir un cuadro agudo con dolores articulares incapacitantes, puede evolucionar hacia la cronicidad en pacientes en los que persisten diferentes grados de artritis y artralgiás 36 meses después de haberse resuelto la infección aguda (4).

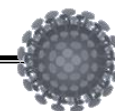
La transmisión de estos tres agentes está relacionada con la disponibilidad de los mosquitos de la especie *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*). Ambos tienen un origen africano, pero se han ido extendiendo hacia regiones tropicales y



subtropicales. Se plantea que durante los años ochenta del pasado siglo XX ya habitaban de manera natural en Estados Unidos, Brasil y en varios países de Europa (5). En la actualidad, están presentes en la mayor parte de los países del continente asiático y en la región de las Américas. Esto ha garantizado la circulación en el nuevo mundo del VDENVZV desde el siglo XVIII (6), y la introducción del VCHIK y el VZIK, en los años 2013 y 2015, respectivamente (7, 8).

Generalmente, estas arbovirosis suelen ocasionar brotes o epidemias en población general con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden ir desde la infección asintomática (VZIK: 80%; VDENVZV: 50%; VCHIK: 15%) hasta cuadros severos (9-11). No obstante, aunque algunos autores describen ciertas particularidades en el cuadro clínico, actualmente se reconoce que es muy difícil establecer una definición de caso para cada arbovirus. La mayoría de los pacientes presenta síntomas y signos similares (12, 13), inclusive éstos pueden producirse por la infección con otros patógenos, con lo que se complica aún más el diagnóstico diferencial (14-17). De todo lo anterior se deriva la importancia de contar con métodos diagnósticos sensibles y específicos que permitan identificar al Arbovirus responsable de las manifestaciones clínicas y con ello de los brotes que producen en población general.

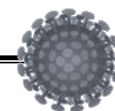
Históricamente, el diagnóstico de la infección por arbovirus se ha realizado a través de herramientas que permiten identificar el virus o sus componentes y otras que permiten caracterizar la respuesta inmune humoral. Éstas últimas se han empleado de forma rutinaria en los sistemas de vigilancia por ser más económicos. Sin embargo, se ha comprobado que los anticuerpos que se generan tras la infección primaria por un Flavivirus, pueden reaccionar de forma cruzada con los antígenos presentes en los ensayos serológicos diseñados para identificar la infección secundaria por otros miembros del mismo género. Lo anterior ha sido reportado en varias investigaciones donde se evidencia reactividad cruzada entre varios miembros del género Flavivirus, por ejemplo con los VDENVZV y VZIK (18, 19), y con Virus del Nilo Occidental (VNO) y el Virus de la Fiebre Amarilla (VFA) (20, 21). Es válido resaltar que este fenómeno de reactividad cruzada también se ha descrito entre los Alfavirus (ejemplo Mayaro y VCHIK) (22, 23).



Estos hallazgos han puesto al descubierto el grado de complejidad al que nos enfrentamos cuando se interpretan los resultados de los ensayos serológicos; creándose un cuello de botella que limita su uso en áreas geográficas en las que circulan varios Arbovirus de manera simultánea (24). Así la comunidad científica internacional ha tenido que desarrollar algoritmos de vigilancia en los que se utilicen métodos de biología molecular para identificar de forma rápida y precisa al arbovirus causante del brote (25). La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR -del inglés- *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real se ha convertido en el método de elección. Para lograrlo, se han diseñado protocolos de RT-PCR en tiempo real múltiples que permiten detectar a varios agentes en un mismo tubo de reacción, con lo que, además, se reducen el costo y el tiempo de obtención de los resultados (25). No obstante, muchas de estas herramientas aún no han sido evaluadas en los países en los que estos arbovirus circulan, como tampoco existe un consenso internacional sobre el método a utilizar por los laboratorios nacionales que están a cargo de su vigilancia.

Diversos factores no modificables de manera inmediata (cambio climático, efecto invernadero, disponibilidad del vector, acceso al agua potable, pobreza, etc) garantizarán la circulación estacional de arbovirus en el continente americano en años venideros. Lo más preocupante es que estarán creadas todas las condiciones para que se introduzcan nuevos agentes que de forma continua evolucionan en diversos ecosistemas (26-28). Por tanto, dependerá de cuán eficientes seamos en la difícil tarea de disminuir la densidad de sus vectores, así como de contar con sistemas de vigilancia lo suficientemente robustos que permitan detectar a tiempo su introducción para garantizar su contención oportuna y la posterior erradicación.

En este sentido se han tenido que crear por organismos internacionales diferentes consorcios entre instituciones científicas de varios países para unir esfuerzos en la caracterización clínica, virológica y epidemiológica de la infección por Arbovirus que circulan de forma autóctona en regiones tropicales. Ejemplo de ello es el proyecto internacional IDAMS (IDAMS –siglas del inglés- *International Consortium*



on *Dengue Risk Assessment, Management and Surveillance*) patrocinado por la unión europea. En él participaron países como Alemania, Viet Nam, Malasia, Indonesia, Cambodia, El Salvador, Brasil, Venezuela y Cuba. El laboratorio nacional de referencia (LNR) de arbovirus del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), estuvo a cargo de la identificación del ARN del VDEN mediante RT-PCR en tiempo real en muestras clínicas colectadas en dos sitios centinelas del estado de Carabobo de Venezuela. En ese país desde el año 2000 y hasta el 2013 existe una hiperendemicidad del VDEN con circulación de los cuatro serotipos, con excepción de los años 2002-2003 en los que sólo circularon tres serotipos (29). Por otra parte, durante el período de ejecución del proyecto, se introdujo en Venezuela el VCHIK y se daba la alerta sobre la posible introducción del VZIKV en el 2016. Esto obligó a que se decidiera explorar además de la circulación del genotipo del VDEN, la presencia del VCHIK y VZIK en diferentes brotes que se identificaron durante el período 2013-2016 en el estado de Carabobo, Venezuela.

OBJETIVOS

General

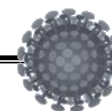
Identificar la causalidad del VDEN, VCHIK y VZIK en brotes de enfermedad similar a dengue en el área metropolitana del estado de Carabobo, Venezuela, durante el período 2013 al 2016.

Específicos

1. Determinar la presencia del ARN del VDEN, VCHIK y VZIK en muestras de plasma de pacientes venezolanos en los que se sospechó clínicamente la infección por VDEN.
2. Identificar el patrón estacional de los arbovirus detectados.
3. Identificar el serotipo del VDEN responsable de los brotes que se produjeron durante el período de estudio.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



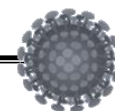
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DEFINICIÓN E HISTORIA DE ARBOVIRUS

Género *Flavivirus*

El género *Flavivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, está compuesto por 53 especies de virus que se dividen en tres grupos: los virus de los cuales no se conoce el vector, los virus transmitidos por garrapatas y los transmitidos por mosquitos(30). En este último grupo se encuentran, entre otros, los VDEN, y el VZIK. El dengue se clasifica como una enfermedad emergente y reemergente debido a la aparición de sus manifestaciones clínicas severas (FHD/SCD), al incremento del número de casos y a la diseminación de sus cuatro serotipos (31). El primer reporte de un caso parecido a Dengue fue realizado en la Enciclopedia Médica China y data de 265–420 AD, la cual lo refiere como “el veneno del agua” asociado con los insectos voladores (32). Este virus, fue aislado por primera vez en Hawai en 1944, y se denominó VDEN-1. En el mismo año se aisló en Nueva Guinea otra cepa relacionada antigénicamente a la que se denominó VDEN-2 (33). En Manila, 1956 y 1960, se aislaron los serotipos 3 y 4 a partir de muestras clínicas de pacientes con un cuadro de dengue hemorrágico (34). La reemergencia de la FD tuvo lugar hace más de veinte años y desde entonces tanto el vector que la transmite, como los serotipos del virus, se han expandido geográficamente provocando un aumento de la actividad epidémica (31).

El descubrimiento del VZIK, también considerado el agente causal de la enfermedad del zika, fue el resultado de un programa de investigación patrocinado por la Fundación Rockefeller de 1914 a 1970, que estudiaba el vector responsable del ciclo selvático del virus de la fiebre amarilla (VFA) en Uganda (35). El primero



de esos aislamientos se logró a partir de muestras clínicas de un mono *Rhesus* (1947) centinela en el bosque Zika. El segundo aislamiento, se logró satisfactoriamente a partir de macerados de mosquitos salvajes de la especie *Aedes africanus* (1948) (36), y su circulación en humanos se demostró mediante estudios serológicos en Uganda y Nigeria (35). El VZIK, es un ejemplo de cómo un agente infeccioso del que no existían evidencias científicas sobre su relevancia clínica en humanos, actualmente se considere un problema de salud a nivel mundial (37).

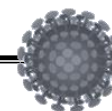
Género Alfavirus

Otro Arbovirus de gran relevancia epidemiológica es el VCHIK, que pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae* (38). Este virus es uno de los miembros del complejo antigénico virus SemlikiForest, junto a otros alfavirus que se encuentran en África (virus O'nyong-nyong), en Suramérica (virus Mayaro) y en la región Australia/Oceanía (virus Ross River), los cuales causan artropatía aguda en humanos (39, 40). El VCHIK es el agente causal de la Fiebre de Chikungunya (CHIKF -del inglés-Chikungunya fever), que inicialmente se registró en el este de África, y se aisló por primera vez luego de la epidemia ocurrida en las costas de Mawia, Makondo y Rondo (actual Tanzania) durante 1952-1953 (41). Por otra parte, la primera epidemia ocurrida en Asia ocurrió en 1958 en Tailandia (42). Desde entonces, se han producido brotes aislados en África y Asia, incluyendo el subcontinente Indio (43). Sin embargo, a partir del 2004 esta enfermedad febril aguda se expandió por las Islas del Océano Índico y las Américas (44), adquiriendo gran relevancia a nivel mundial.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ARBOVIRUS

Género Flavivirus

De manera general, el genoma de los flavivirus está constituido por ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena y polaridad positiva, estructurado como un ARN mensajero (ARNm). Además, está compuesto aproximadamente por 11 Kb (45), con un único marco de lectura abierto (ORF -del inglés- Open Reading Frame) flanqueado por regiones no codificantes (UTR -del inglés-



UnTranslatedRegions) en ambos extremos (46). Este ORF codifica para una gran poliproteína, que se procesa postraduccionalmente para dar a tres proteínas estructurales (cápside (C), premembrana (prM), envoltura (E)), y a siete proteínas no estructurales (NS – del inglés- Non structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5))(Figura 1) (47).

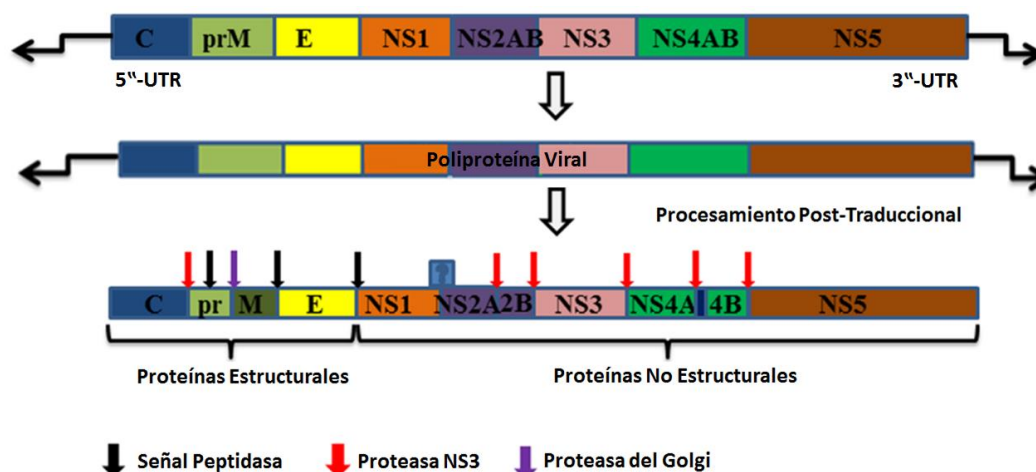
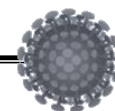


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VZIK, tomado y modificado de Rastogi y colaboradores en 2016 (tomado y modificado de Fros JJ y colaboradores en 2010) (47).

En relación a la estructura de la partícula viral de VZIK, mediante criomicroscopía electrónica se ha demostrado que esta revela muchas similitudes con el VDENV, pero también posee algunas diferencias. Los viriones de VZIK son partículas de aproximadamente 40 nm de diámetro (48), mientras que los de VDENV presentan aproximadamente 50 nm de diámetro (49). Un análisis cualitativo realizado por Ekins y colaboradores en 2016, reveló que el VZIK presenta las espículas de la superficie ligeramente más elevadas; además, la ranura de la glicoproteína de la E es más estrecha, mientras que en VDENV el poro de intersección entre los 5 dímeros es más grande (50).

Género Alfavirus

El genoma de los Alfavirus, está compuesto por una sola cadena de ARN de polaridad positiva con aproximadamente 12 Kb (51). Dicho genoma consiste de una región no traducible 5' metilada seguida de dos ORFs y de una señal de



poliadenilación en el extremo 3'. El ORF 5' codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP- del inglés- non structural Protein (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4)), las cuales están involucradas en la replicación viral (52). Por otra parte, el ORF 3' codifica para una poliproteína que es procesada en proteína de la cápside (C), dos glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) y dos péptidos pequeños (E3 y 6k) (53, 54). Dichas proteínas estructurales son necesarias para la formación de la cápside y la envoltura viral (55, 56).

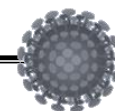
PROTEÍNAS VIRALES

Género Flavivirus

Las proteínas estructurales C, prM y E, están ubicadas en la posición N-terminal de la poliproteína(57)(Figura 1) y forman la estructura de la partícula viral de este virus. La primera de estas proteínas (C), tiene un peso molecular de aproximadamente 11 kDa(58) y su composición le permite interactuar con el ARN viral, que favorece la formación de la nucleocápside(59). Dicha proteína presenta un extremo C-terminal hidrofóbico que funciona como péptido señal para la translocación que sufre prM en el retículo endoplasmático (RE) (58). La proteína C madura se pliega formando un dímero compacto, en el cual cada monómero contiene cuatro α -hélices. La proteína de la C se asocia a la membrana mediante una región hidrofóbica interna (60).

La proteína prM tiene un peso de 26 kDa(58) y luego de procesarse proteolíticamente libera su extremo N-terminal para dar lugar a la proteína M (8 kDa). Habitualmente prM se puede identificar en viriones inmaduros en el interior de las células infectadas, en cambio la proteína M generalmente está presente en el virión maduro, en el compartimiento extracelular. La disociación del heterodímero de prM y la reorganización de la proteína de la E son responsables de la morfología que adquiere el virión(61).

La proteína E es el componente mayoritario de la superficie del virión con 500 aminoácidos, en dicha proteína se identifican tres dominios, denominados I, II y III (62). El Dominio II contiene una secuencia altamente conservada entre los flavivirus, el péptido interno de fusión (63). En la proteína E radican las principales

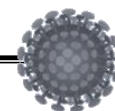


funciones biológicas del virión tales como reconocimiento del receptor celular, fusión a la membrana celular y morfogénesis del virión(64). Una característica morfológica distintiva del virión de VZIK con respecto a otros flavivirus (como VDENV) es la presencia de un lazo extra en la proteína de la E cerca del sitio de glicosilación(65), pero aún se desconoce su función.

La primera de las proteínas no estructurales, según el orden en que están ubicadas en el genoma, es la NS1 con aproximadamente 46 kDa (58). Esta proteína tiene sitios de glicosilación necesarios para la replicación viral en las células de mosquitos y para la neurovirulencia en ratones (66). La forma intracelular de NS1 juega un papel importante en la replicación del genoma localizando los sitios de síntesis del ARN viral. Mientras que la forma extracelular es altamente antigénica e induce una fuerte respuesta humoral (58).

La NS2 es una proteína hidrofóbica relativamente pequeña de aproximadamente 22 kDa (58). La región codificante para NS2 produce dos proteínas independientes (NS2A y NS2B). La proteína NS2A puede encontrarse atravesando la membrana y además se ha localizado en posibles sitios de replicación del ARN. La proteína NS2B está asociada a la membrana, y es un cofactor requerido para la función serina proteasa de la NS3 (67).

NS3 es una proteína trifuncional de aproximadamente 70 kDa(58), con actividad proteasa, helicasa y ARN trifosfatasa. Esta proteína se asocia a la membrana a través de su interacción con NS2B. La forma serina-proteasa (NS2B-NS3) puede también regular la activación de la respuesta de IFN tipo I en células dendríticas (58, 68). La NS3 es la fuente principal de epítopes de células T (69). La estructura de la NS3 helicasa del VZIK es similar a la de la ARN helicasa del VDENV, con algunas variaciones en las conformaciones de los bucles involucrados en la unión de ATP y ARN. Jain y colaboradores hipotetizan que al igual que en VDENV, el ATP se une al lado inferior de la hendidura entre los dominios 1 y 2 de la NS3 helicasa, mientras que el ARN se acomoda en un túnel que separa los dominios 1 y 2 del dominio 3 de dicha proteína (70).

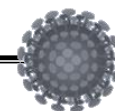


La proteína NS4 se modifica postraduccionalmente y da lugar a NS4A y NS4B. NS4A y NS4B son pequeñas proteínas hidrofóbicas de aproximadamente 16 kDa y 27 kDa respectivamente (58). Teniendo en cuenta la distribución de NS4A y su interacción con NS1, se plantea que NS4A pudiera participar en la replicación del ARN anclando componentes de la replicasa a la membrana celular (58). NS4B se localiza en sitios de replicación del ARN, pero también aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo (71).

NS5 es una fosfoproteína multifuncional altamente conservada de aproximadamente 103 kDa(58) que funciona como ARN polimerasa ARN dependiente y también como metiltransferasa(72). La metilación en la guanina 7 del extremo de la caperuza en esta proteína es esencial para la correcta replicación del virus (73). NS3 y NS5 funcionan juntas durante la formación de la caperuza del ARN viral (74). Recientemente, Sironi y colaboradores en 2016, detectaron que en VZIK existe una selección positiva sobre las proteínas NS4B y NS5. Estos autores concluyen que esta selección positiva juega un rol importante en la modulación de la replicación viral y contribuye a la evasión de la respuesta inmune (75).

Género Alfavirus

La membrana viral está cubierta por un enrejado proteico altamente organizado de trímeros del heterodímero E2/E1 (76, 77), donde E2 media la unión al receptor, mientras que E1 es una proteína de fusión de membrana clase II (77, 78). Existen numerosos estudios que reflejan el papel de esta glicoproteína viral en la respuesta inmune que desencadena el hospedero. Tal es el caso de un estudio que demuestra como el VCHIK afecta la regulación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B – del inglés- nuclear factor kappa B) en las células sinoviales como parte de una posible estrategia para facilitar la infección (79). Además, en otro estudio más reciente se encontró a la proteína E1 en estrecha unión con la proteína THBS1, la cual es capaz de bloquear la actividad del NF- κ B mediante la unión con su receptor (80).



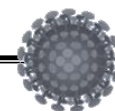
Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de que E1 pudiera estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune del hospedero (81).

La glicoproteína E2 es una proteína transmembrana que se organiza en tres dominios tipo inmunoglobulina (A, B y C). El dominio A se encuentra en el centro y parte superior del heterotrímero, y tiene los sitios de unión al receptor y a los anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, el dominio B está en la punta de la proteína, mientras que el dominio C se ubica hacia la membrana viral, lo cual hace que este dominio no sea accesible para los anticuerpos (54, 82).

La E3 es una glicoproteína pequeña rica en cisteínas que sirve como secuencia señal para el precursor pE2, el cual contiene a la proteína viral E3 y E2. Además, dicha proteína está involucrada en el correcto plegamiento de E2, y es necesaria para la heterodimerización de E2 con E1. Como parte del heterodímero precursor pE2E1, E3 impide la activación prematura de E1 (54).

La proteína de la cápside es multifuncional y juega un papel crucial en el ensamblaje de los Alfavirus. Dicha proteína es capaz de autoclivarse antes del reconocimiento y unión del ARN genómico (83). Además de su papel principal en la formación de la nucleocápside, la proteína de la cápside ha mostrado funciones regulatorias y/o inhibitorias en relación a la replicación viral, así como en la síntesis de proteínas virales y del hospedero (84, 85). La proteína viral 6K sirve como péptido señal para E1, y es cortada de E1 y E2 por una peptidasa señal. Esta proteína es importante para la salida de los viriones a través de la superficie celular, donde se incorporan cantidades pequeñas de la misma en el virus (86).

La nsP1 es una proteína viral de aproximadamente 60 kDa, que presenta en su dominio N-terminal motivos metiltransferasa que dirigen la reacción de caperuza (87-89). Luego del dominio N-terminal existen regiones en tándem que permiten la asociación de la proteína nsP1 con las membranas del hospedero (90-92). Durante la replicación, la proteína nsP1 es responsable por la adición de la caperuza 5' en el ARN genómico y subgenómico luego de la preparación de las moléculas de ARN nacientes, debido a la actividad trifosfatasa-positiva de la proteína nsP2 (93). También se conoce que la proteína nsP1 es importante para la

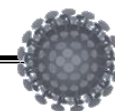


síntesis de las moléculas de ARN de polaridad negativa, las cual sirven para la síntesis de la nueva progenie viral (94, 95).

La nsP2 es una proteína viral de aproximadamente 90 kDa, la cual tiene funciones importantes en el cese de la transcripción celular y en la inhibición de la respuesta antiviral (96, 97). En el contexto de la replicación viral, nsP2 actúa como una helicasa, una trifosfatasa y una proteasa. Además de estos roles, nsP2 está involucrada íntimamente en la supresión de la síntesis macromolecular en el hospedero (97-99).

Históricamente, la importancia funcional de la proteína nsP3 (de aproximadamente 60 kDa) ha sido menos estudiada. La proteína nsP3 posee un dominio único de Alfavirus que se localiza en la porción central de la proteína, y que es una región muy conservada en este género. Las manipulaciones genéticas realizadas en este dominio han resultado en defectos en la síntesis de ARN de polaridad negativa y subgenómico, en el procesamiento de poliproteínas y en la neurovirulencia(100-102), pero el mecanismo de estos efectos aún se desconoce. Por otra parte, los análisis mutacionales realizados en la región hipervariable de la nsP3 han evidenciado que existe una gran tolerancia a cambios significativos en este dominio en cultivos de tejido (100, 102-104). Además, los diferentes estados de fosforilación que puede presentar dicha proteína, hacen que el dominio hipervariable sea responsable de la formación de complejos célula-virus en las células infectadas (105-107). Lo anterior sugiere que el dominio hipervariable puede ser un determinante significativo en la patogénesis mediante su interacción con los factores específicos al tipo de célula (108).

Mientras todas las proteínas no estructurales del VCHIK están involucradas en la síntesis del ARN viral, la proteína nsP4 (de aproximadamente 70 kDa) es la única responsable de las propiedades sintetizadoras del ARN del complejo replicasa viral. Dicha proteína contiene el dominio y los motivos del núcleo de la ARN polimerasa ARN-dependiente (RpRd). A pesar que la proteína nsP4 es la única proteína viral con actividad RpRd, se conoce que la replicación del VCHIK requiere



de la suma de las actividades coordinadas entre las proteínas no estructurales (108).

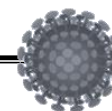
PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Género Flavivirus

Los viriones maduros de Flavivirus, tienen un coeficiente de sedimentación que varía entre 170 y 210 S y tienen una densidad de aproximadamente 1,19 g/cm³ a 1,23 g/cm³(58). Los viriones de VDENV y ZIKV son estables a pH ligeramente alcalino (8.0), pero se inactivan fácilmente a pH ácido, a temperaturas por encima de los 40 °C, en presencia de disolventes orgánicos o detergentes, por irradiación y por exposición a la luz ultravioleta (109, 110). Análisis de microscopía electrónica de ZIKV, infieren que su inusual estabilidad constituye una explicación alternativa a su particular patología (111). A 37 °C la vida media del ZIKV es aproximadamente 2 veces mayor que la vida media de VDENV (11,8 y 5,2 horas respectivamente). Sin embargo, la incubación a 40°C acelera la pérdida de la infectividad viral (110). Similar a como ocurre en VDENV, incrementos en la eficiencia de maduración del virión aumentan la estabilidad de ZIKV. También, mutaciones en residuos de la proteína de la envoltura del ZIKV aumentan su estabilidad sin afectar la vida media del virión. Es válido señalar que el ZIKV además puede conservarse durante 6 meses en glicerol al 50% y es susceptible al éter anestésico (112).

Género Alfavirus

El virión de los Alfavirus se inactiva por desecación y temperaturas mayores a los 58 °C(51, 113). Además, es sensible al éter y a varios desinfectantes como la solución de hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2%, formaldehído y etanol al 70%.

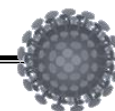


CICLO REPLICATIVO

Género Flavivirus

Se reconocen dos mecanismos mediante los cuales los flavivirus interactúan con la célula huésped, la interacción del virus con el receptor celular (más común en VZIK) y la unión del virus a la célula por formación de inmunocomplejos (IC) (más común en VDEN) (114). En algunos tipos celulares la entrada del virus se facilita mediante la unión de los complejos virus-anticuerpos formados en respuesta a la infección, con los receptores para la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulinas ($\text{Fc}\gamma\text{-R}$) sobre la superficie de esas células, potenciando la infectividad dada por el incremento de la entrada del virus a la célula diana(115). Ocurre la internalización de los mismos formándose el endosoma y es en ese compartimento, probablemente mediado por la proteína E(116), se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular de endosoma, liberándose la nucleocápside en el citoplasma (58). Aunque son pocos aún los estudios, algunos autores apoyan la idea de que la unión del IC al $\text{Fc}\gamma\text{-R}$ no es suficiente para que ocurra la internalización de la partícula viral, sino que requiere el receptor específico del virus (117). La unión de la inmunoglobulina G (IgG) al $\text{Fc}\gamma\text{-R}$ propicia el acercamiento del virión infeccioso a la proximidad de su receptor (118) a través del cual entra. De esta manera, el anticuerpo específico al virus y el $\text{Fc}\gamma\text{-R}$ juntos, actúan como correceptores, potenciando la eficiencia de unión del virus e incrementando el número de células infectadas (119).

En el caso de VZIK, ha sido descrito un receptor de tirosina kinasa, el AXL, como posible receptor de las células glías, astrocitos y células endoteliales (120). Este receptor también presenta un rol importante, pues el bloqueo o silenciamiento de AXL reduce en un 90% la infectividad viral en cultivos de fibroblastos y células epiteliales alveolares (121). La primera interacción de estos virus se cree que tiene lugar con elementos de unión de baja afinidad presentes en la superficie celular, para después ser transferido a un segundo receptor proteico capaz de unir e internalizar el virus.



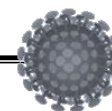
Entre los elementos que interactúan con baja afinidad se encuentran una lectina de tipo C (DC-SIGN), en el caso particular de VDENV también interviene un homólogo de DC-SIGN, el L-SIGN, y en caso de VZIK actúa además Tyro3(120). De ellos el mejor caracterizado es el DC-SIGN, el cual captura inicialmente el virus en la superficie celular incrementando la concentración local. La internalización del virión tiene lugar con el auxilio de un receptor de alta afinidad (122). Una vez en la superficie celular, el virión penetra en las células por endocitosis dependiente de clatrina (33), componente esencial en la formación de la vacuola endocítica. Luego ocurre un proceso de fusión entre las membranas de dicho compartimento y la envoltura viral, liberándose la nucleocápside en el citoplasma(123), lo que facilita la salida del ARN viral al citosol(124). Una vez que el genoma viral se libera en el citoplasma, la región 5' no traducida (5'UTR) conduce al ARN hacia los ribosomas, donde ocurre la traducción del único ORF (125). La poliproteína resultante es procesada co y postraduccionalmente para dar lugar a las 10 proteínas virales.

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C y el ARN, así como la adquisición de la envoltura, ocurren intracelularmente. Las partículas del virión inmaduro se transportan en vesículas que salen de la membrana del retículo endoplasmático (RE) y por un mecanismo específico son translocadas al pre-Golgi, pasando posteriormente al aparato de Golgi. En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular (126).

La liberación del virus puede ocurrir por fusión de la membrana de las vesículas exocítica, que contienen al mismo, con la membrana plasmática, o por efecto citopático, a través de rupturas puntuales en la membrana que lo separan del espacio exterior (127).

Género Alfavirus

El ciclo replicativo del VCHIK, que tarda solo 4 horas (51, 113), ocurre en el citoplasma tanto de las células de vertebrados como en las de insectos (128). Inicialmente el virus entra en las células susceptibles mediante el proceso de endocitosis a través de un receptor aún desconocido. Debido a que el ambiente

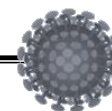


endosomal es ácido, ocurren cambios conformacionales en la envoltura viral que permiten la fusión de la membrana viral con la de la célula diana, lo cual posibilita la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Primeramente, el ARN genómico se traduce en 4 proteínas no estructurales (nsPs), las cuales forman el complejo de replicación. Luego, el genoma se sintetiza en una cadena en sentido negativo, la cual posteriormente se usa como molde para la síntesis del ARN viral 49S y el ARNm subgenómico 26S. Para producir las proteínas estructurales (C-E2-6K-E1) se requiere que sea traducido el ARNm subgenómico, y luego estas proteínas se procesan por serinaproteasas. Posterior a este procesamiento, la cápside se libera en el citoplasma, y el resto de las proteínas se modifican postraduccionalmente en el RE y luego en el aparato de Golgi. Las glicoproteínas E1 y E2 se asocian como un dímero y se transportan hacia la membrana citoplasmática del hospedero. Dichas proteínas se incorporan al final del proceso replicativo en la superficie del virión, mientras que previamente la cápside forma la nucleocápside icosaédrica que contiene el ARN genómico 49S. De esta manera queda conformado el virión maduro, el cual se libera de la célula infectada una vez que adquiere una bicapa a partir de la membrana del hospedero (56, 113, 129).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las infecciones por VZIK, VDEN y VCHIK, generalmente transcurren de manera asintomática o leve, y presentan cuadros clínicos similares en la fase temprana de la enfermedad, tales como fiebre, cefalea, artralgia, mialgia, erupción maculopapular, dolor retroorbital y linfadenopatías(130). Debido a las similitudes en las manifestaciones clínicas en estos tres agentes, el diagnóstico clínico de las mismas es todo un reto, principalmente porque se han propuestos diferentes algoritmos diagnósticos sin que se haya podido establecer un algoritmo único(130).

Se conoce muy poco acerca de la historia natural de la infección por VZIK, y la percepción inicial como una enfermedad leve ha cambiado por los descubrimientos continuos de complicaciones neurológicas graves (tales como el SGB) e infecciones congénitas. Sin embargo, las infecciones leves son frecuentes

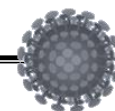


y se caracterizan por fiebre, mialgia, conjuntivitis, cefalea, edemas y vómitos (131). Por otro lado, los estudios preliminares para determinar la duración del período de incubación del VZIK, se han centrado en investigaciones con personas que recibieron transfusiones de sangre en la Polinesia Francesa, los cuales fueron positivos a este virus por la técnica de RT-PCR, y además presentaron manifestaciones clínicas de 3 a 10 días luego de la transfusión(132). Sin embargo, un estudio más actual, indicó un período de incubación de 3 a 14 días en 197 viajeros sintomáticos con una infección reciente por VZIK (133). Estos datos coinciden con los reportados para el VDEN. En este último, la mayoría de las infecciones son autolimitadas ya que generalmente los pacientes desarrollan fiebre alta, erupción repentina en la piel, mialgia y cefalea. Durante la fase inicial, no existen diferencias clínicas entre los pacientes que progresan o no hacia un dengue grave. Aquellos pacientes que evolucionan hacia este cuadro severo de la enfermedad, manifiestan hemorragias leves e incluso puede verse comprometida la vida del paciente. La anterior expresión clínica se caracteriza por un comienzo rápido en la fuga capilar con hemorragia, acompañada de trombocitopenia y daño hepático, y en algunos casos puede conducir a la muerte(134).

Por otra parte, el período de incubación del VCHIK tiene un rango de 1 a 12 días, y generalmente el comienzo de las manifestaciones clínicas es abrupto. Dentro de los principales síntomas que aparecen durante la infección por este virus, se encuentran fiebre alta, cefalea, mialgia, y artralgia que afecta principalmente las articulaciones de los miembros(135).El dolor articular asociado con el VCHIK puede ser muy intenso, y su duración puede oscilar desde pocos días hasta años, por lo que puede seguir un curso agudo, subagudo o crónico en dependencia del tiempo de evolución(136).

DIAGNÓSTICO DE LAS ARBOVIROSIS

El diagnóstico clínico diferencial entre VZIK, VDEN y VCHIK es actualmente todo un reto debido a la gran similitud entre los cuadros clínicos que producen. Por lo tanto, las pruebas de laboratorio tienen un papel esencial en el diagnóstico etiológico de estas arbovirosis. La muestra idónea común para estos tres agentes



es el suero, sin embargo es válido resaltar que el diagnóstico de VZIK también se realiza en otro tipo de muestra clínica, como por ejemplo la orina. Debido a que la detección del ARN viral en suero está limitada a los primeros 5 días de la enfermedad (137), la orina es la muestra de elección para alargar el tiempo de detección del VZIK luego de la disminución de la viremia(138).

De manera general, en pacientes con síntomas clínicos, el suero debe ser colectado durante los primeros 4 días luego del comienzo de la enfermedad, para realizar pruebas que permitan detectar una infección por VZIK, VDEN o VCHIK(137). Sin embargo, generalmente los anticuerpos IgM persisten por 2-12 semanas luego de una infección por arbovirus. Este último elemento constituye la base del diagnóstico serológico, sobre todo en el caso de VDEN y VCHIK (136). En el caso del VZIK, la duración de los anticuerpos IgM anti-VZIK aún no se conoce con exactitud, no obstante, existen algunas evidencias sobre el empleo de los mismos como una herramienta útil en el diagnóstico del síndrome de infección congénita por VZIK(139). Sin embargo, la utilización de los anticuerpos IgM e IgG en el diagnóstico de laboratorio presenta un gran reto, ya que la sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan estos anticuerpos están muy poco establecidas. Además existe una fuerte reactividad cruzada entre VZIK y VDEN, y otros flavivirus, lo cual dificulta aún más la implementación de pruebas serológicas en el diagnóstico de una arbovirosis(140).

Otras pruebas diagnósticas están encaminadas hacia la detección de antígenos virales, tal es el caso del VDEN, ya que durante la fase aguda, la proteína viral NS1 puede ser detectada mediante ensayos inmunoenzimáticos(ELISA -del inglés- EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay). Sin embargo, este tipo de prueba aún no está disponible para el caso del VZIK(141), lo cual representa un problema, ya que un resultado negativo en muestras de suero mediante RT-PCR, no descarta la infección por este virus debido a que su viremia es muy corta. Por tales motivos, existe una necesidad inminente en el desarrollo de pruebas serológicas para detectar la infección por VZIK(136).

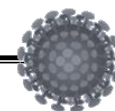
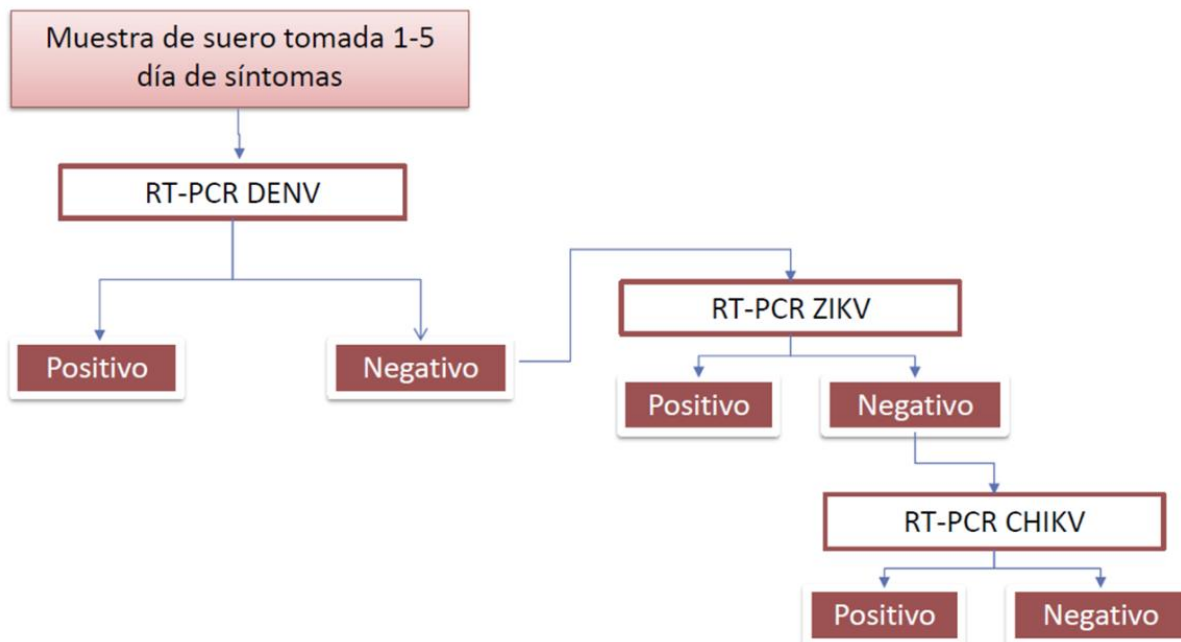
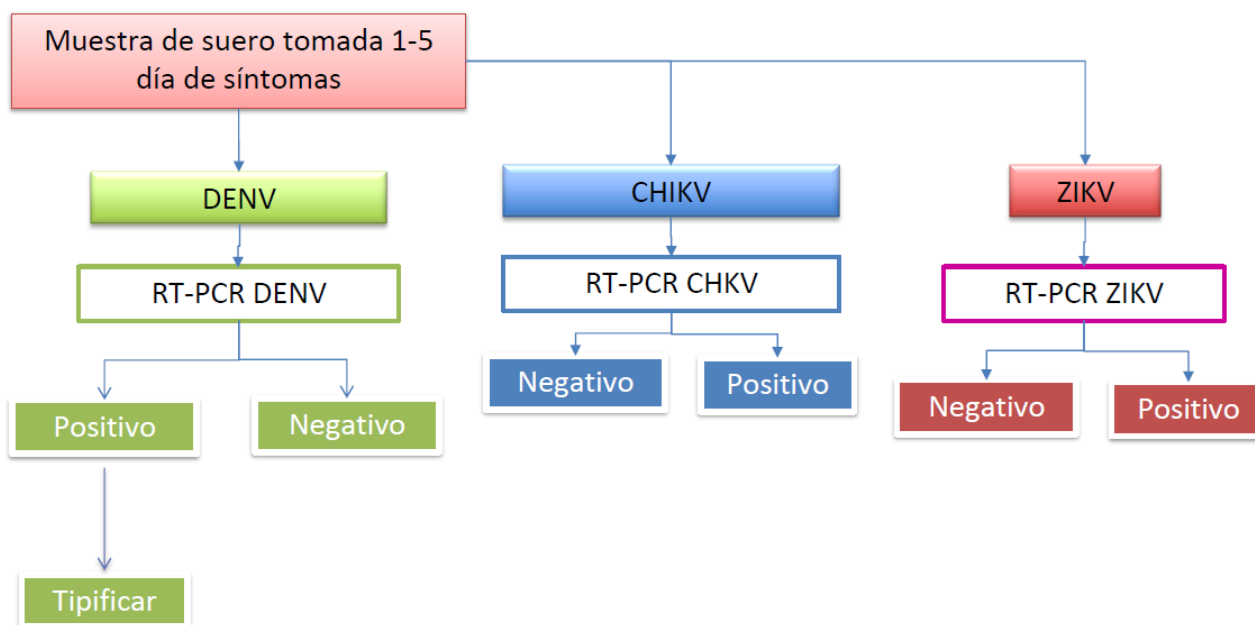
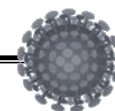
**A****B**

Figura 2. Algoritmo para la vigilancia integrada de las arbovirosis (A: Secuencial; B: Paralelo) (142).

Otra de las pruebas que se utilizan para diagnosticar una infección por algún Arbovirus, es la prueba de neutralización por reducción del número de placas (PRNT, -del inglés-Plaque Reduction Neutralization Test). Dicha prueba mide los anticuerpos neutralizantes virus-específicos, y es capaz de determinar la causa de



una infección primaria con una alta especificidad. Sin embargo, esta prueba es muy costosa y laboriosa(137).

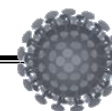
Epidemiología

Algunos Arbovirus que inicialmente circulaban en el Viejo Mundo se han introducido en la actualidad en el continente Americano(143). El primero de ellos fue el VFA durante los siglos XVII- XIX, a partir de esclavos provenientes de las costas del Occidente de África(144). Posteriormente, comenzó la circulación del VDEN en la región de las Américas, y actualmente continúa su transmisión en dicha región(145). En el año 1999, el VNO se introdujo en la ciudad de Nueva York, y en pocos años se dispersó por todo el continente(146). Por otra parte, el VCHIK se detectó en la Isla San Martín en 2013, luego de una epidemia en la Polinesia, y en la actualidad, dicho agente viral ha circulado por la mayoría de los países de la región(8). Una situación similar ocurrió con el VZIK, ya que el mismo se introdujo en el continente Americano, específicamente en Brasil, a inicios del año 2015(147). Este virus continuo dispersándose por gran parte del continente, y para finales de 2015 se había extendido a lo largo de América del Sur, Centroamérica y el Caribe(148).

En el caso específico de Venezuela, las infecciones por VDEN, VZIK y VCHIK han aumentado en las últimas décadas, Las infecciones por VDEN continúan siendo un importante problema de salud en niños venezolanos (149), sin embargo, existe un gran desconocimiento de la enfermedad en la población (150). En 2014, el VCHIK se introdujo en Venezuela, y se convirtió rápidamente en una arbovirosis de gran importancia debido a los casos graves y fatales reportados (151). Además, actualmente según la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), Venezuela constituye el tercer país con mayor número de casos de VZIK en la región de las Américas, seguido de Brasil y Colombia(152). Dicha situación se ha complejizado aún más debido a la dispersión de este virus en todo el país(153), junto a la circulación conjunta de los VDEN y VCHIK.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSO DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un estudio observacional descriptivo prospectivo desde octubre de 2013 hasta febrero del 2016 en dos servicios ambulatorios de salud: Canaima y La Isabelica ubicados en el área metropolitana de la ciudad de Valencia, que es la capital del estado de Carabobo de Venezuela (Figura 3).

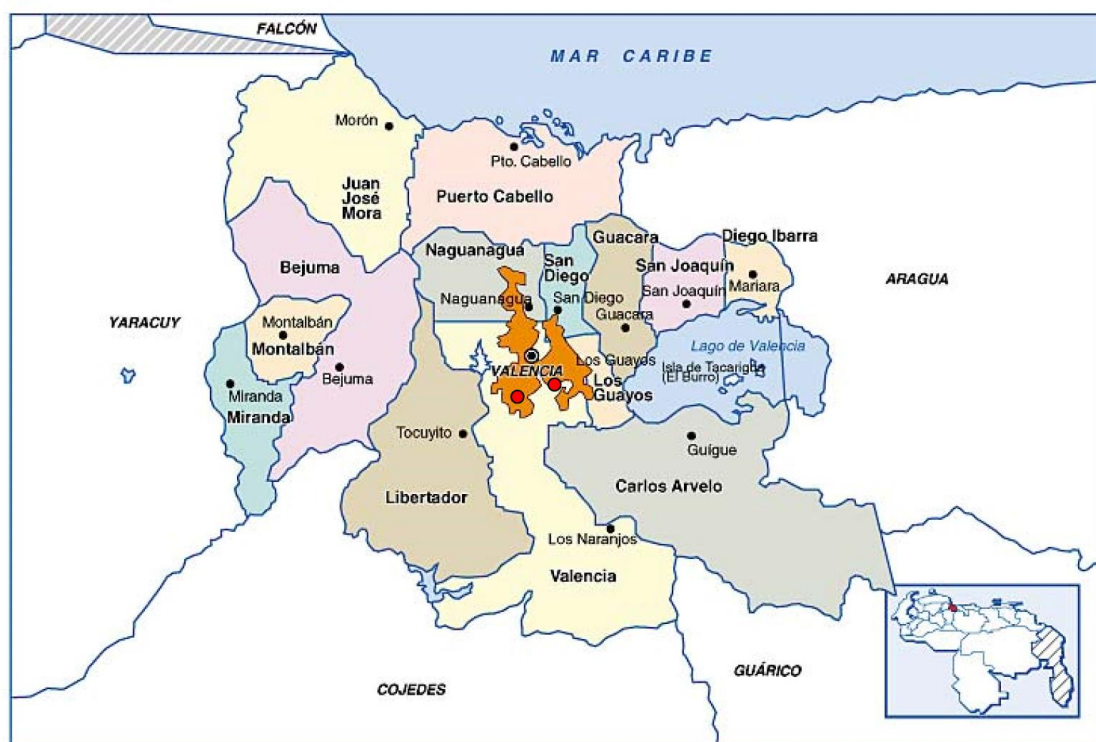
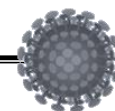


Figura 3. Mapa del estado de Carabobo, Venezuela. Los círculos rojos señalan la ubicación de las dos instituciones de salud que participaron en el estudio: **Izquierda:** Ambulatorio Canaima, **Derecha:** Ambulatorio La Isabelica).



El estimado de habitantes del estado de Carabobo es de 2 442 823 (18). En ella, existe un panorama urbano muy variable, pues existen zonas bien diseñadas con acceso total a servicios públicos pero hay otras áreas muy pobres (asentamientos/arrabales) sin acceso a agua potable ni electricidad. En la costa norte del distrito del estado de Carabobo está ubicado el tercer puerto más importante de Venezuela (Puerto Cabello), en el que ocurren las principales actividades de importación/exportación. El clima local muestra una media anual de temperatura en el rango entre 23 °C y 26 °C, con un acumulado anual de precipitaciones entre 700 y 1 199 milímetros.

Para la selección de los pacientes se siguieron los siguientes criterios:

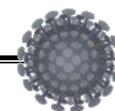
Criterios de Inclusión

Cualquier paciente que solicitó servicios de salud ambulatorios en alguna de las dos clínicas ambulatorias cumpliendo con los siguientes criterios:

- Fiebre o historia de fiebre de menos de 72 horas de evolución.
- Síntomas clínicos sugestivos de una posible infección por arbovirus (ejemplo sospecha de dengue y/o fiebre indiferenciada en un paciente que reside en un área endémica de arbovirus.
- Edad mayor de 5 años.
- Consentimiento informado escrito para participar en el estudio, ya sea por el paciente o el tutor legal.

Criterios de Exclusión

- Identificación de signos de focalización del Síndrome febril que sugieran un diagnóstico alternativo (ejemplo neumonía, otitis, etc).
- Que el médico de asistencia infiera que el paciente no se presentará para seguimiento diario (ejemplo problemas de transporte o distancia de la clínica).
- El paciente fue ingresado en el momento del reclutamiento al proyecto producto de un dengue grave u otra condición médica.

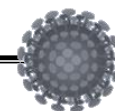


A cada individuo se le colectaron entre tres y cinco mililitros de sangre en EDTA durante las primeras 72 horas de iniciado el cuadro clínico con el objetivo de utilizar el plasma para el diagnóstico molecular. Un cuestionario clínico estructurado se completó diariamente para todos los participantes en el estudio. La ficha de recolección de datos (FRD) incluyó una descripción detallada de signos y síntomas clínicos, así como resultados estándares de exámenes de laboratorio. Los pacientes se evaluaron diariamente en las clínicas de los servicios ambulatorios hasta lograr su completa recuperación, encontrándose sin fiebre durante 48 horas, o hasta 6 días después de haber sido incorporados al estudio.

Toda la información clínica se documentó y se les realizó un hemograma completo en cada visita. En la última visita (4-6 días de la enfermedad aguda) se tomó una segunda muestra para perfil bioquímico al mismo tiempo que para realizar la serología (en caso que el paciente no regresara a la visita de seguimiento). Se programó a todos los pacientes una visita de seguimiento entre los días 10 a 14 de la enfermedad, es decir, al menos una semana después de la última visita en la que se colectó una muestra para serología y un hemograma.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Durante la presente investigación se siguieron los estándares internacionales para la conducta ética en las investigaciones que involucran ensayos con humanos. Se obtuvo la aprobación del comité institucional y nacional de ética en investigación de Venezuela. Todos los procedimientos empleados en los estudios clínicos y de laboratorio cumplieron con las leyes nacionales y de la Unión Europea con respecto a las investigaciones con participantes humanos. Se integró desde el inicio un programa independiente de monitoreo clínico que aseguró el cumplimiento de los estándares de Buenas Prácticas Clínicas. El equipo de trabajo describió el propósito del estudio, los procedimientos, posibles riesgos y beneficios, los derechos y responsabilidades de los participantes y las alternativas a la inscripción al estudio. Los pacientes o los padres/responsables fueron invitados a hacer preguntas que fueron debidamente respondidas por el equipo local del proyecto. En caso de acceder el paciente o el padre/responsable legal a

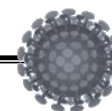


participar en el estudio, se les pidió la firma del documento de consentimiento informado.

Se explicó a los pacientes y a los médicos de asistencia que los exámenes diagnósticos específicos de arbovirus sólo se realizarían al finalizar el estudio en laboratorios de investigación incluso fuera de Venezuela. Uno de los objetivos del proyecto fue evaluar la precisión diagnóstica en la identificación de aquellos pacientes que progresaran a la forma grave del dengue grave sin introducir el sesgo en la interpretación de los exámenes de laboratorio por parte de los clínicos. Sólo contaron con los exámenes de rutina que se realizaron en cada hospital.

Se garantizó la confidencialidad de toda la información que se generó en el estudio. Todos los datos (incluyendo datos clínicos, de laboratorio, y genéticos) se guardaron en bases de datos protegidas por contraseñas. Los nombres de los participantes sólo se documentaron al momento del reclutamiento para permitir su identificación en las visitas de seguimiento. Sin embargo, la información que pueda identificar a los pacientes se vinculó únicamente a los datos o muestras en una Lista Maestra protegida la que no se compartió fuera del equipo de trabajo y se acordó que no se transferirá ninguna información que pueda identificar a los pacientes entre los sitios clínicos. Todos los formularios de recolección de datos y las muestras se etiquetaron únicamente con un número de identificación del estudio y se guardaron en un sitio seguro. Solo las personas locales que firmaron un compromiso de protección de datos tienen acceso a la contraseña de la computadora donde se guardan los datos.

Finalmente se reclutaron 1 928 pacientes para participar en el proyecto, pero sólo en 265 individuos se demostró una infección similar al VDENV por métodos serológicos (IgM/IgG anti virus DENV). Los ensayos serológicos se realizaron en muestras de suero colectadas después del quinto día de iniciado el cuadro clínico en los laboratorios de la Universidad de Carabobo de Venezuela. El LNR de Arbovirus del IPK asumió entre las tareas del proyecto la realización del diagnóstico molecular de la infección por arbovirus mediante RT-PCR en tiempo real.



MUESTRAS CLÍNICAS

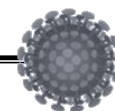
En el LNR de Arbovirus del IPK se recibieron 265 muestras de plasma que se transportaron desde Venezuela por vía aérea en contenedores que contenían hielo seco. Todas las muestras se almacenaron entonces a -80°C hasta ser procesadas para la purificación de los ácidos nucleicos. Se excluyó del estudio una muestra de plasma proveniente de un paciente del ambulatorio La Isabelica al identificarse una inhibición en el PCR en tiempo real. Por tanto, en el presente estudio sólo se incluirá el análisis de los resultados de las 264 muestras de plasma (Tabla 1). Lamentablemente, no se recibió la información clínica de cada paciente incluido en el proyecto a pesar de que todas las muestras se procesaron y se enviaron los resultados de los ensayos del PCR en el tiempo acordado. Esto limita el análisis pues no se podrán realizar asociaciones con todas las variables clínicas colectadas en los FRD.

Tabla 1. Distribución de las muestras de plasma según el año y el ambulatorio de salud del estado de Carabobo de Venezuela.

AÑOS	AMBULATORIO LA ISABELICA	AMBULATORIO CANAIMA	TOTAL
2013	2	7	9
2014	81	79	160
2015	56	14	70
2016	25	-	25
Total	164	100	264

EXTRACCIÓN DEL ARN

La purificación del ARN se realizó a partir de 140 μL de las muestras de plasma empleando el estuche comercial QIAamp viral RNA (Qiagen, Alemania). Todo el procedimiento se realizó de forma automatizada en extractor QIAcube (Qiagen, Alemania) utilizando un volumen de elusión final de 60 μL de agua libre de nucleasas. El ARN purificado se almacenó a -20°C hasta su procesamiento por RT-PCR en tiempo real.



RT-PCR EN TIEMPO REAL

En el presente estudio se emplearon dos protocolos de RT-PCR en tiempo real que fueron diseñados y estandarizados por la División de Enfermedades Transmitidas por Vectores, subdivisión de Dengue en Puerto Rico, de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC-siglas del inglés- *Centers for Disease Control and Prevention*) de Estados Unidos de América (EUA). Ambos estuches fueron gentilmente donados al LNR de Arbovirus del IPK a través de las oficinas regionales de la OPS/OMS. Ambos protocolos están basados en la metodología de sondas de hidrólisis o TaqMan®, fueron validados por la administración de alimentos y medicamentos (FDA -siglas del inglés-*Food and Drug Administration*) de EUA, autorizándose para uso en el diagnóstico *in vitro* (IVD –siglas del inglés- *In-vitro Diagnostic Use*) en muestras de humanos.

Mediante el protocolo múltiple Trioplex rRT-PCR es posible identificar en el mismo tubo de reacción la presencia/ausencia del ARN del VDEN, VCHIK y VZIK en diferentes muestras clínicas. Éste ensayo nos permitió identificar el arbovirus presente en las muestras de plasma. En aquellos casos en los que se detectó el ARN del VDEN se procedió entonces a identificar el genotipo de los virus del complejo Dengue (1-4) a través del ensayo múltiple de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC.

Cebadores y sondas

Las secuencias de los cebadores y sondas del protocolo Trioplex rRT-PCR todavía no se han publicado, pero se conoce que están dirigidos a secuencias específicas de los genes de envoltura, la región 5' no codificante y la proteína no estructural 1 (nSP1 -siglas del inglés- *non Structural Protein 1*) del VIZK, VDEN y VCHIK, respectivamente (Tabla 2). Este protocolo múltiple permite detectar y diferenciar de forma cualitativa el ARN de VDEN, VCHIK y VZIK en muestras de suero, sangre total, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido amniótico (LA).

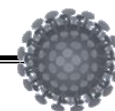


Tabla 2. Cebadores y sondas del protocolo Trioplex RT-PCR en tiempo real del CDC (CDC; catálogo #KT0166).

Cebadores	Ubicación del Gen	Fluorocromo de la Sonda
VZIK-F	Gen de la envoltura	Texas Red
VZIK-R		
VZIK-P		
VDEN-F	5'-UTR	FAM
VDEN-R1		
VDEN-R2		
VDEN-P		
VCHK-F	nSP1	VIC
VCHK-R		
VCHK-P		
RP-F	Ribonucleasa P humana	FAM
RP-R		
RP-P		

Cada una de las sondas tiene un marcaje con fluorocromo específico que emite fluorescencia a una determinada longitud de onda. Otra característica importante de este estuche es que se incluye un juego de cebadores y sonda para la amplificación de un fragmento del gen de la RNasa P (RP) humana que está presente en todas las muestras clínicas. Su detección permite descartar la presencia de inhibidores en las muestras, errores durante el proceso de extracción del ARN y la posible degradación del ARN por la mala conservación. Su amplificación tiene lugar en un tubo aparte con una mezcla específica como se describirá más adelante.

El otro protocolo que se empleó en el presente estudio para identificar el genotipo del VDEN fue el RT-PCR en tiempo real de VDEN-1-4 diseñado por Santiago y colaboradores (154). Las secuencias de los cebadores y sondas, así como el marcaje con fluorocromos específicos de cada una de las sondas que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda se describen en la tabla 3.

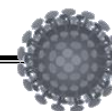


Tabla 3. Cebadores y sondas del protocolo de RT-PCR en tiempo real de VDEN-1-4 de los CDC.

Cebadores	Ubicación del Gen	Secuencia	Fluorocromo de la Sonda
VDEN-1 F	NS5	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	FAM
VDEN-1 R		CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	
VDEN-1 P		CATGTGGYTGGGAGCRCGC	
VDEN-2 F	E	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	HEX
VDEN-2 R		CCATYTGCAGCARCACCATCTC	
VDEN-2 P		CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA	
VDEN-3 F	prM	GGACTRGACACACGCACCCA	TEXAS RED
VDEN-3 R		CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	
VDEN-3 P		ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	
VDEN-4 F	prM	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	Cy5
VDEN-4 R		TCCACCYGAGACTCCTTCCA	
VDEN-4 P		TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG	

Mezcla de la reacción de RT-PCR en tiempo real

Para la mezcla de la reacción de ambos protocolos de RT-PCR en tiempo real se utilizó la mezcla de enzimas del estuche comercial *SuperScript III Platinum/One-Step qRT-PCR System*, de Invitrogen, EUA. En un área de trabajo limpia utilizando Cabina de Flujo de Aire horizontal (AIRTECH) se preparó una mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 15 µL y 20 µL de reacción para los ensayos Triplex rRT-PCR y el RT-PCR de VDEN (1-4), respectivamente (Tabla 4-6). Una vez concluida la preparación de la mezcla, éstas se distribuyeron en pocillos de placas de 96 [*Micro Amp Fast Optical 96-well reaction Plate with Barcode (0.1 mL)*], de Applied Biosystems (ABI), EUA, que se transportaron protegidas de la luz ambiental y en refrigeración hacia el área de amplificación del LNR de Arbovirus, del IPK.

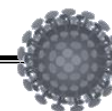


Tabla 4. Reactivos empleados en la mezcla de reacción del RT-PCR en tiempo real de VDEN (**SuperScript III Platinum/One-Step qRT-PCR System, invitrogen).

Reactivos		RT-PCR de VDEN (1-4)
Agua libre de RNasas		2.2 µL
Solución Tampón 2X		12,5 µL
Cebadores	VDEN-1 F	0,5 µL
	VDEN-1 R	0,5 µL
	VDEN-2 F	0,25 µL
	VDEN-2 R	0,25 µL
	VDEN-3 F	0,5 µL
	VDEN 3 R	0,5 µL
	VDEN-4 F	0,25 µL
	VDEN-4 R	0,25 µL
Sondas	VDEN-1	0,45 µL
	VDEN-2	0,45 µL
	VDEN-3	0,45 µL
	VDEN-4	0,45 µL
Mezcla de enzimas **		0,5 µL
Volumen final		25 µL

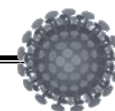
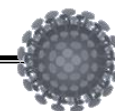


Tabla 5. Reactivos empleados en la mezcla de reacción del Trioplex rRT-PCR en tiempo real (*Las sondas ya vienen incorporadas junto a los cebadores; **SuperScript III Platinum/One-Step qRT-PCR System, invitrogen).

Reactivos		Trioplex rRT-PCR
Agua libre de RNasas		0,5 µL
Solución Tampón 2X		12,5 µL
Cebadores y sondas *	VDEN	0,5 µL
	VZIK	0,5 µL
	VCHIK	0,5 µL
Mezcla de enzimas **		0,5 µL
Volumen final		15 µL

Tabla 6. Reactivos empleados en la mezcla de reacción de la RP PCR en tiempo real (*Las sondas ya vienen incorporadas junto a los cebadores; **SuperScript III Platinum/One-Step qRT-PCR System, invitrogen).

Reactivos	RP PCR (Control Interno)
Agua libre de RNasas	1,5 µL
Solución Tampón 2X	12,5 µL
Cebadores y sonda *	0,5 µL
Mezcla de enzimas **	0,5 µL
Volumen Final	15 µL



Controles de la RT-PCR en tiempo real

En cada ensayo de RT-PCR que se realizó, se siguieron las recomendaciones establecidas en las instrucciones para el uso que acompañan a cada uno de los estuches.

Controles positivos

En el Trioplex rRT-PCR se empleó un control positivo (CP) para el VZIK, otro para VDEN y uno para VCHIK. En el caso del protocolo de RT-PCR del VDEN (1-4), se empleó como control positivo una mezcla de antígenos en el que se incluyen diferentes cepas del VDEN aisladas en Puerto Rico todas inactivadas por calor. Todos los CP están incluidos en los estuches de PCR (Tabla 7).

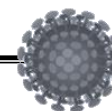
Tabla 7. Controles positivos empleados en los protocolos de PCR en tiempo real (CP: Control Positivo).

Componentes		Origen	Volumen de Rehidratación	Estado
CP VDEN	VDEN-1	Humano, Puerto Rico 2006	1,5 mL	Liofilizado
	VDEN-2	Humano, Puerto Rico 1998		
	VDEN-3	Humano, Puerto Rico 2004		
	VDEN-4	Humano, Puerto Rico 1998		
CP VCHIK		Humano, Puerto Rico 2013	1,5 mL	Liofilizado
CP VZIK		Zika PRVABC59	1,5 mL	Liofilizado
CP HSC		Material de células humanas no infeccioso	2 mL	Liofilizado

Controles negativos

Durante la ejecución del presente estudio, se incluyó como control negativo (CN) en cada lote de extracción automática un tubo que contenía 140 µL de agua libre de nucleasas que se siempre se procesaron en las mismas condiciones que las muestras clínicas. Diez microlitros del producto purificado del CN se sometieron a amplificación por PCR para descartar posibles contaminaciones en el proceso de extracción.

Asimismo, se incluyó un control libre de ARN molde (NTC: -siglas del inglés- *Non Template Control*) por cada lote de mezclas de reacción de PCR que se



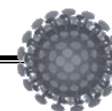
prepararon (Tabla 3). Éste estuvo constituido por 10 μ L de agua libre de nucleasas que se adicionaron en la placa de reacción en el área de preparación de las mezclas. Con este NTC se monitorearon las posibles contaminaciones de los reactivos en el área de preparación de las mezclas del PCR.

Control interno

Como control positivo de la reacción de la RP se incluyó la muestra de control humano (HSC -del inglés- *Human Sample Control*). Este control no es más que material de células humanas cultivado, inactivado y no infeccioso. El mismo, se extrae al mismo tiempo que las muestras clínicas.

Proceso de amplificación y detección

Diez microlitros del ARN previamente purificado de cada una de las muestras clínicas se añadieron en paralelo en pocillos específicos que contenían la mezcla de reacción tanto para la detección del virus, como para la detección del gen de la RNAsa P. Esto se llevó a cabo en la Cabina de Trabajo UVP (*DBA Analytik Jena*, California, Estados Unidos) en el área de amplificación, utilizando puntas con barreras libres de nucleasas. Posteriormente, se añadieron 10 μ L del ARN purificado de los CP, CN y del HSC, así como un pocillo para el NTC (Fig. 4). Entonces se procedió a sellar la placa con película adhesiva para evitar la evaporación de la mezcla de reacción y se colocó en termociclador ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems®, EUA.



A

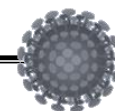
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Trioplex rRT-PCR	RP	Trioplex rRT-PCR	RP	Trioplex rRT-PCR	RP	Trioplex rRT-PCR	RP	Trioplex rRT-PCR	RP	Trioplex rRT-PCR	RP
B												
C												
D											CP VDEN	
E											CP VZIK	
F											CP VCHK	HSC
G											CN	CN
H											NTC	NTC

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)	RT-PCR de VDEN (1-4)
B												
C												
D												
E												
F												CP Pool de Ag VDEN 1-4
G												CN
H												NTC

Figura 4. Esquema de la placa de reacción del RT-PCR en tiempo real para Trioplex rRT-PCR (A) y VDEN (B). Se muestra la distribución de las muestras clínicas y los diferentes controles que siempre se incluyeron en cada una de las corridas que se realizaron en ABI 7500 FAST DX de Applied Biosystems.

Utilizando el programa Sequence Detection Software (Versión 1.4.1, IVD) la mezcla se sometió al siguiente ciclaje en protocolo estándar: Ciclo de reverso transcripción a 50°C durante 30 min, inactivación de la transcriptasa inversa *SuperScript III* y activación de la *Taq Polimerasa* a 95°C por 2min, seguidos de 45 ciclos de amplificación que incluyeron un paso de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y 1 minuto a 60°C. Durante este último ciclo se estableció la detección



de la fluorescencia en los canales específicos para cada uno de los fluorocromos que se emplearon en el marcaje de la sonda.

Análisis e interpretación de los resultados

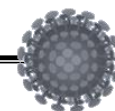
Una vez concluida la corrida del RT-PCR en tiempo real, los datos se guardaron y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante del instrumento.

Validación de la corrida

Antes de emitir el resultado individual de cada una de las muestras analizadas, se procedió a validar la corrida de cada uno de los ensayos de RT-PCR en tipo real analizando los resultados de los controles que se incluyeron en los protocolos ejecutados. Así se consideró que la corrida era válida si se detectaba:

- Curva de amplificación en los canales específicos para VDEN (FAM), VCHIK (VIC) y VZIK (Texas Red) dentro del rango de valor esperado del Ct para el protocolo de Trioplex rRT-PCR.
- Curva de amplificación en los canales específicos para VDEN 1 (FAM), VDENV 2 (HEX), VDEN 3 (Texas Red) y VDEN 4 (Cy5), dentro del rango de valor esperado del Ct en el pocillo en el que se aplicó la mezcla de antígenos del ensayo RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4.
- No señal fluorescente en el pocillo del NTC.
- Curva de amplificación en el pocillo en el que se añadió el ARN del HSC utilizando el juego de cebadores y sonda de la prueba del control interno RP.

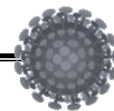
En el protocolo del Trioplex el análisis es obligatorio que se realice de forma independiente para cada una de las secuencias específicas utilizando el modo manual para establecer la línea umbral (-del inglés- *Threshold Cycle*). Ésta línea se ubicó en el sitio en el que se inicia la fase exponencial de la curva de amplificación y siempre por encima de cualquier señal de ruido. Las curvas verdaderamente positivas deben poseer las tres fases que se describe durante la amplificación en los ensayos de tiempo real, ellas son: fase exponencial o logarítmica, fase lineal y fase de meseta. Los resultados generados en las mezclas



con juegos de cebadores y sonda específicos para cada secuencia diana (VDEN, VCHIK, VZIK y RP) se interpretarán como positivos si se genera un incremento exponencial de la fluorescencia que cruza el umbral (Ct siglas del inglés- *Cycle Threshold*) antes del ciclo 38 (Tabla 8).

Tabla 8. Tomado y traducido de las instrucciones para el uso del *Trioplex Real-time RT-PCR Assay EDIC 6-04-2017*

VZIK	VDEN	VCHIK	RP	INTERPRETACIÓN	REPORTE
-	-	-	+	Negativo	No se detectó VDEN, VCHIK o VZIK por RT-PCR en tiempo real
-	-	-	-	Indefinido	Muestra en la que no se puede definir ARN a VDEN, VCHIK o VZIK mediante RT-PCR en tiempo real. Puede deberse a que la muestra no es la adecuada.
-	+	-	+/-	Positivo para VDEN pero negativo para VZIK y VCHIK	ARN de VDEN detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VZIK ni VCHIK mediante RT-PCR en tiempo real.
-	-	+	+/-	Positivo para VCHIK pero negativo para VZIK y VDEN	ARN de VCHIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VZIK ni VDEN mediante RT-PCR en tiempo real.
+	-	-	+/-	Positivo para VZIK pero negativo para VCHIK y VDEN	ARN de VZIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VCHIK ni VDEN mediante RT-PCR en tiempo real.
-	+	+	+/-	Positivo para VDEN y VCHIK pero negativo para VZIK	ARN de VDEN y VCHIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VZIK mediante RT-PCR en tiempo real.
+	+	-	+/-	Positivo para VDEN y VZIK pero negativo para VCHIK	ARN de VDEN y VZIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VCHIK mediante RT-PCR en tiempo real.
+	-	+	+/-	Positivo para VZIK y VCHIK pero negativo para VDEN	ARN de VZIK y VCHIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real. No se detectó ARN de VDEN mediante RT-PCR en tiempo real.
+	+	+	+/-	Positivo para VZIK, VDEN y VCHIK	ARN de VZIK, VDEN y VCHIK detectado mediante RT-PCR en tiempo real.

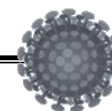


ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se confeccionó una base de datos con los resultados del PCR mediante el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics version 19* en la que se incluyó el año y mes de colecta de la muestra, el ambulatorio de origen (La Isabelica o Canaima), valor del Ct para el arbovirus específico, el genotipo de DENV identificado. Se construyeron tablas de contingencia y se compararon las variables utilizando la prueba de *Chi* cuadrado o de *Fisher* según correspondiera, se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05. El riesgo se estimó con un intervalo de confianza del 95%. Para comparar los valores del Ct entre los arbovirus identificados se empleó la prueba de ANOVA y en caso de significación estadística se realizó Prueba de *Tukey* con un nivel de significación de 0.05.

CAPÍTULO IV

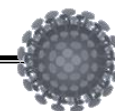
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actual emergencia de las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores confirma la mala preparación de los sistemas de salud a nivel mundial para predecir, responder y contener de forma rápida las epidemias que estos agentes causan (136). El VZIK, flavivirus transmitido por un vector, se ha convertido en una amenaza para la salud humana desde su emergencia fuera de África en el 2007 (131). La epidemia que este virus causó entre los años 2013 y 2014 en la Polinesia Francesa mostró que además del cuadro autolimitado y benigno, es capaz de producir complicaciones neurológicas severas en adultos (SGB) (155). Aún más, su reciente introducción en Brasil le permitió expandir el espectro de patologías que induce, al identificarse complicaciones neurodegenerativas (ejemplo microcefalia) y otros desordenes genéticos en hijos de madres infectadas con el VZIK durante la gestación. Actualmente, las consecuencias de su efecto teratogénico se agrupan en el Síndrome de infección congénita por VZIK que se actualiza de forma continua con los datos que reportan los países en los que este agente ha circulado (25).

Las dificultades para contener la transmisión del VCHIK y del VDEN en años previos, prueban de lo complejo que resulta controlar el vector (*Aedes aegypti*). Se ha observado que la aplicación de bajos volúmenes de insecticidas, el uso de larvicidas y la movilización comunitaria tienen una limitada eficacia como únicas medidas para controlar la enfermedad producida por arbovirus (156). A esto se añade la carencia de sistemas de vigilancia en países en vías de desarrollo que no poseen ni la infraestructura, ni el personal capacitado para realizar técnicas de avanzada para identificar oportunamente la circulación de los arbovirus. Estas



limitaciones reales hicieron que aunque se anticipó en la mayoría de los países del continente americano la introducción del VZIK, sólo se desarrollaran intervenciones al detectarse los primeros casos sintomáticos (se estima que el 20% de las infecciones por VZIK son sintomáticas) (157). Esto condujo al retraso en la respuesta, una ineficaz contención y en consecuencia una rápida diseminación del virus por todo el continente.

En este escenario internacional se enmarca el presente estudio. Venezuela, un país con hiperendemicidad del VDEN, fue testigo entre el 2014 y 2016 del patrón explosivo de las recientes epidemias de los arbovirus reemergentes VCHIK y VZIK (158). Según los resultados obtenidos en la presente investigación, se detectó la infección por al menos un arbovirus en 181 (68.6 %), de los 264 pacientes en los que se diagnosticó un cuadro clínico sospechoso de dengue. Mediante el protocolo múltiple Trioplex rRT-PCR se identificó en orden de frecuencia la infección por VCHIK, VDEN y VZIK en 121 (66.9%), 50 (27.6%) y 10 (5.5%) pacientes; respectivamente (Tabla 9). Resultados similares se reportaron en Puerto Maldonado hacia el este de Perú en el año 2017, donde se identificó una mayor frecuencia de infección por el VCHIK, seguida por el virus Oropuche (VORO), VDEN y VZIK en pacientes con síndrome febril agudo, pero en un período de estudio de tan sólo tres meses (159). Por el contrario, recientemente Sánchez y colaboradores reportaron que en orden de frecuencia se encontró que el VDEN, VZIK y VCHIK fueron los arbovirus que circularon en la costa norte del Perú (160).

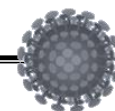
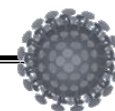


Tabla 9. Distribución de los casos según los arbovirus identificados

VARIABLES		%
Total de pacientes	264	100
Casos confirmados de infección por VDEN	50	27.6
Casos confirmados de infección por VCHIK	121	66.9
Casos confirmados de infección por VZIK	10	5.5
Casos donde no se detectó ARN de VDEN, VCHIK o VZIK	83	31.4

Estos hallazgos resaltan la variabilidad de los patrones de circulación de los arbovirus, inclusive en un mismo país. A lo que habría que añadir el posible efecto de las diferencias en cuanto al: diseño de la investigación, los protocolos diagnósticos que emplean, los criterios de inclusión, el número de pacientes estudiados, el período de estudio, entre otros. De cualquier forma, sólo la identificación a nivel de país de los factores que favorecen la introducción/circulación de estos agentes permitirá establecer mecanismos sostenibles para el control de sus vectores.

Un resultado importante de la presente investigación es que en el 31,4 % de los pacientes en los que se sospechó la infección clínica por VDEN no se detectó el ARN ni del VDEN, ni VCHIK ni del VZIK (Tabla 9). Más preocupante aún es que en el 100% de las muestras estudiadas se descartó la presencia de inhibidores del PCR al detectarse señal fluorescente por encima del umbral en el tubo de reacción de control interno (RNAsa P positivas). Todos los pacientes estudiados tenían manifestaciones clínicas que obligaron al médico de asistencia a plantear etiológicamente la infección por arbovirus. Por tanto, no se puede descartar la posible infección por otros arbovirus que actualmente circulan en el continente americano (161-164), aunque su diagnóstico no se incluyó entre los objetivos del presente estudio. Incluso, podría plantearse que la causa de la enfermedad pudiera estar asociada a la infección por un arbovirus no identificado aún, pero que está causando un cuadro similar a dengue en individuos residentes en el estado de Carabobo, Venezuela (26, 165, 166). Se conoce de la existencia de

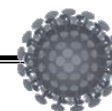


arbovirus que circulan de forma natural en determinadas zonas geográficas con un elevado potencial para producir futuras epidemias (167).

Múltiples serían las variables que hipotéticamente limitaron la detección del genoma viral en las muestras de plasma estudiadas, entre ellas: la calidad en la colecta, transportación y almacenaje de las muestras (168), la dinámica de replicación con cifras de carga viral muy bajas (por ejemplo VZIK) (169, 170), la variabilidad de la respuesta inmune individual (171), la sensibilidad analítica del ensayo de Trioplex (168), entre otros. A pesar de la indiscutible sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR, sus limitaciones como herramienta diagnóstica hacen que en los sistemas de vigilancia no sea necesario confirmar la infección en el 100% de los pacientes que cumplen con la definición de caso. Su principal utilidad radica en identificar el virus que a través de la picadura de un mosquito está causando un brote en una población específica.

Entonces, consideramos oportuno exponer una de las limitaciones del análisis del presente estudio que deriva del desconocimiento de los datos clínicos y epidemiológicos, así como de los resultados de los ensayos serológicos que se realizaron a los pacientes estudiados. Éstos habrían permitido caracterizar de forma integral a cada paciente, comparando el patrón serológico con los resultados del PCR. Sólo de esta forma se podría descartar la infección por los arbovirus estudiados en los pacientes con clínica sugestiva de su infección. Esta es una información muy importante a tener en cuenta cuando se interpretan los resultados de las pruebas diagnósticas, a las que siempre habría que integrar el análisis clínico, epidemiológico y entomológico. De lo contrario se podrían llegar a conclusiones erradas y con ello a la toma de decisiones no idóneas que limitarán el control eficiente del vector.

En el gráfico 1 se muestra el número de casos en los que se confirmó la infección por Arbovirus según el año en el que se detectaron por los servicios ambulatorios de salud. El VDEN fue el Arbovirus que circuló en el estado de Carabobo con mayor frecuencia, detectándose casos en el 2013, 2014 y 2015. Sin embargo, sólo se confirmó la infección por VCHIK y VZIK en los años 2014 y 2016,



respectivamente; hallazgos que coinciden con el momento en que se reportó la introducción de estos agentes por las autoridades de salud de Venezuela (172).

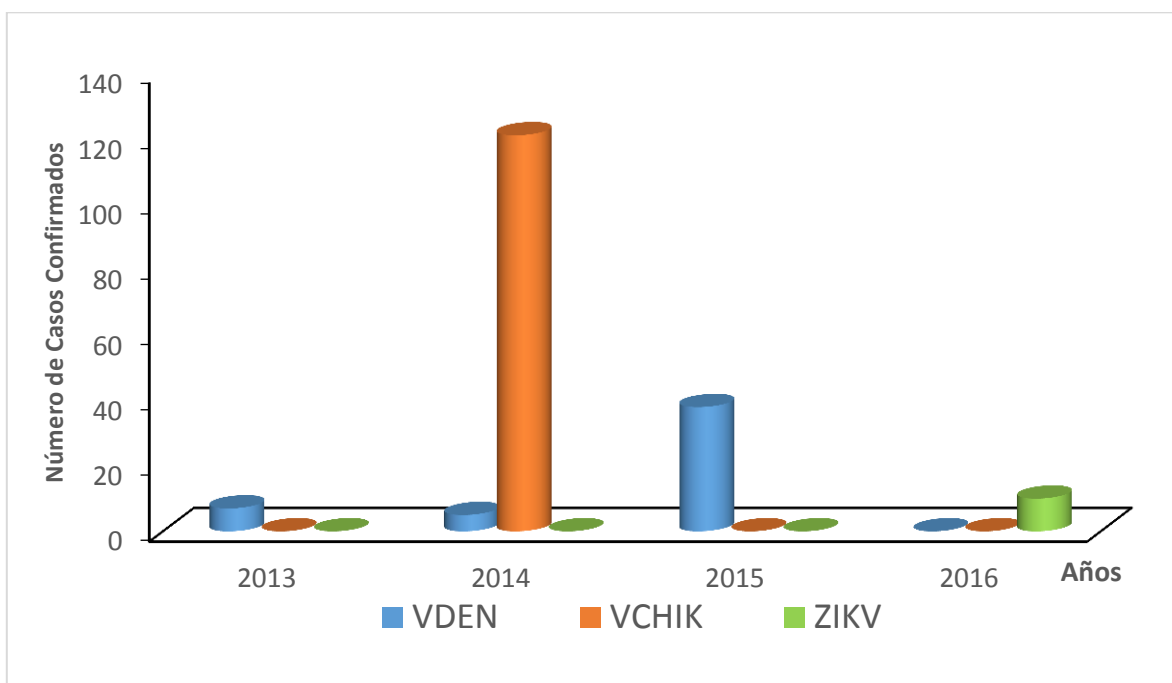
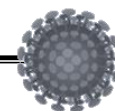


Gráfico 1. Distribución del número de casos en los que se confirmó la infección por VDEN, VCHIK y VZIK mediante protocolo múltiple Trioplex rRT-PCR según el año de colecta en muestras de plasma de pacientes venezolanos en los que se sospechó la infección por VDEN en el estado de Carabobo, Venezuela (2013-2016).

El dengue es una de las enfermedades olvidadas (NTDs –siglas del inglés *Neglected Tropical Diseases*) de mayor importancia en Venezuela, observándose un incremento en su incidencia, magnitud y frecuencia de los brotes durante los últimos años. El incremento anual en su incidencia es de aproximadamente 9.5%, entre 1991 y 2016. Ha aumentado diez veces el promedio de casos entre los inicios de los 90 (39.5 casos x 100 000 habitantes) y el período 2010-2016 (368 casos x 100 000 habitantes). A nivel de país se ha observado un promedio de incidencia del dengue de 157 casos por 100 000 habitantes (rango 13 - 438) en los últimos 26 años. Aún más, a partir del 2007 se han producido seis epidemias (2007, 2009-2010, 2013, 2014, 2015) con una intensificación en la frecuencia y la magnitud de los brotes en comparación con los cuatro años epidémicos en los 16 años anteriores al 2007 (1995, 1997-1998, 2001). Según reportes de autores de

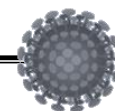


Venezuela, la mayoría de estos años epidémicos coincidieron con el evento de "El Niño" (173).

Hasta el momento, la mayor epidemia de dengue que se ha registrado en Venezuela ocurrió en el 2010 en la que se identificaron 125 000 casos, de ellos 10 300 (8.6%) evolucionaron hacia la forma severa del dengue. Durante ese año Venezuela fue el tercero del listado de países de América que mayor número de casos de dengue reportó y el segundo lugar en el número de casos de dengue severo. Entre las medidas para el control del dengue que se ejecutan en ese país se incluyen algunas estrategias para reducir el vector. Sin embargo, en los últimos años éstas no se han aplicado de forma regular o incluso hay lugares en los que no se realizan (27).

En Venezuela, como en el resto de los países de América y del mundo, el control de la infección por virus dengue y su vector ha demostrado ser un reto debido al incremento en la densidad poblacional, el deterioro de las condiciones de vida, la inestabilidad en el suministro del agua potable y el deterioro en los servicios de salud (174). Venezuela ha experimentado un incremento en la incidencia del dengue asociada posiblemente con la crisis en el sector de la salud, por recortes en el presupuesto en ese sector, así como una escasez en medicinas debido a limitaciones económicas y técnicas, según han reportado científicos locales (9, 21, 175, 176). A pesar de las medidas de control que se han ejecutado en Venezuela, la transmisión del dengue es persistente con un promedio de 40 000 casos anuales en años no epidémicos (177).

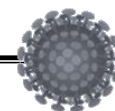
Si se analiza la distribución del dengue entre países de América del sur encontramos que en el 2009 tuvo lugar un brote en el área metropolitana de Buenos Aires, Argentina. Durante este evento epidemiológico se sospechó que el 54.5 % de los 227 casos confirmados de dengue fueron casos importados desde la República de Bolivia y de algunas provincias del norte de Argentina. El resto fueron clasificados como casos autóctonos (178). En ese mismo año, el ministerio de salud de Argentina declaró a OPS alrededor de 26 000 infecciones y seis muertes. No obstante, aunque sólo se confirmaron 744 casos y se reportaron sólo



cinco muertes, se estima que el número real de infecciones duplicó las cifras reportadas de forma oficial (179). En Chile, ocurrió un brote en las islas de Pascua en el 2002, en el que se identificaron 636 casos de dengue, pero ninguno evolucionó a la forma hemorrágica. El caso índice que posiblemente dio origen a ese brote se sospecha que haya sido un viajero que regresó de Brasil o Tahití (180). En Paraguay, ocurrió un brote en el 2006 en el que se confirmaron 1 884 casos de dengue y por primera vez en ese país se identificaron 55 casos que evolucionaron a la forma hemorrágica (11). Todos estos datos señalan el problema real de salud que los virus del complejo dengue producen en varios países del continente americano, en los que se ha establecido su circulación y con lo que se garantiza su expansión a otros países de la región y del mundo.

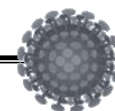
En diciembre 2013 se detectó por primera vez la transmisión autóctona del VCHIK en la Región de las Américas. Desde entonces y hasta la semana epidemiológica (SE) 20 del 2014, se identificó la transmisión autóctona VCHIK en seis estados miembros y nueve territorios en la subregión del Caribe; Anguila, Antigua y Barbuda, Dominica, Guadalupe, Guayana Francesa, Haití, Islas Vírgenes Británicas, Martinica, República Dominicana, Saint Kitts y Nevis, San Bartolomé, San Martín (Parte francesa), San Vicente y las Granadinas, Santa Lucía y Sint Maarten (Parte holandesa) (28). Se identificó la transmisión vertical del VCHIK entre el 27.7% y el 48.29% de las madres sintomáticas en la región de las Américas (181).

Según los reportes de las autoridades del Ministerio de Salud de Venezuela a la oficina regional de la OPS, se identificaron durante el 2014, 34 642 casos sospechosos de VCHIK, de los que sólo se confirmaron 2 303 (28). En varios países de Europa se reportó la presencia de casos importados de VCHIK provenientes de Venezuela (182-184) y mediante análisis filogenético se demostró que el VCHIK que circuló en el estado de Aragua en el 2014 perteneció al genotipo asiático (grupo del Caribe) (185). Inclusive, se identificaron algunos casos con desenlace fatal y/o formas severas de la infección por VCHIK (151).



En Venezuela, el primer caso autóctono del VZIK se registró a finales de noviembre del 2015, cuando al mismo tiempo se observaba un incremento sostenido de casos de dengue desde agosto de ese mismo año (172), según se corroboró en los resultados de la presente investigación. Por tanto, los pacientes incluidos en la presente investigación en los que se detectó el ARN del VZIK constituyen los primeros casos confirmados de infección por VZIK en el estado de Carabobo de Venezuela. Hasta enero de 2018 las autoridades de salud de Venezuela reportaron a la OPS 2 413 casos confirmados de infección por VZIK, 933 de SGB y ningún caso de microcefalia (156, 157). Es importante destacar que, según el reporte de la OPS del 25 de agosto del 2017, no se ha confirmado la transmisión autóctona vectorial del VZIK en ningún nuevo país o territorio de las Américas desde la semana epidemiológica (SE) 44 de 2016; por lo que se mantiene en 48 el número de países y territorios de las Américas que confirmaron la transmisión autóctona vectorial de este agente (110).

En Colombia se identificaron puntos calientes de transmisión del VZIK en la frontera con Venezuela, con implicaciones para su diseminación internacional (186). En China se demostró la introducción en múltiples ocasiones del VZIK a partir de viajeros que regresaban de Venezuela, en los que se identificó el genotipo asiático como el genotipo infectante (187-189). También se logró el aislamiento del VZIK (VEN/2016) a partir de las muestras de esos pacientes. Dicha cepa se utilizó por ese colectivo de autores de China para evaluar la neurovirulencia en modelo murino comparándola con la cepa de Cambodia/2010. De esa forma encontraron que la cepa VEN/2016 produjo un daño cerebral más severo, lo que podría explicar en cierta medida por qué la variante del VZIK que circula en el continente americano es más neurovirulenta (190). En el estado de La Florida, se reportó un caso de Síndrome de Infección congénita por VZIK con lesiones en la retina de un recién nacido de seis días, producto de una madre en la que existían antecedentes clínicos de infección por VZIK en la semana 12 de gestación cuando aún residía en Venezuela (191). Las principales manifestaciones oculares del Síndrome de Infección Congénita por VZIK también fueron descritas por autores venezolanos (192).

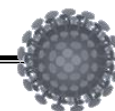


En España, se demostró la persistencia por 93 días del VZIK en el semen de un viajero que resultó infectado en Venezuela (193). Uno de los pocos casos en los que se logró demostrar la transmisión postnatal del VZIK a través de la lactancia materna se realizó en una pareja madre-hijo residentes en Venezuela, en los que se logró secuenciar el genoma completo de este agente (194). No obstante, estos hallazgos no son suficientes para sugerir la interrupción de la lactancia materna en los países con transmisión del VZIK. Todos los hallazgos previos constituyen evidencias científicas del impacto negativo de la infección por el VZIK en el estado de salud de individuos residentes en Venezuela. Inclusive, la amenaza real de su introducción en poblaciones susceptibles en las que existe el vector competente que podría favorecer su circulación autóctona en humanos.

Al analizar la distribución de los casos teniendo en cuenta el ambulatorio en el que fueron atendidos los pacientes no se encontraron diferencias significativas entre ambas áreas del estado de Carabobo (Tabla 10). Todas las muestras que resultaron positivas a VZIK se colectaron en el ambulatorio de La Isabelica, pero en esta etapa no se recibieron muestras del ambulatorio de Canaima, por lo que no se puede inferir que este flavivirus no estuviese circulando en esa área del estado de Carabobo.

Tabla 10. Distribución del número de casos según el ambulatorio de salud en el que se colectaron las muestras de plasma en el estado de Carabobo, Venezuela (2013-2016) (NDT: no detectable).

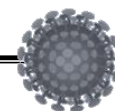
Año de colecta	Ambulatorio Isabelica				Ambulatorio Canaima			
	VDEN	VCHIK	VZIK	NDT	VDEN	VCHIK	VZIK	NDT
2013	2	0	0	0	5	0	0	2
2014	1	64	0	16	4	57	0	18
2015	28	0	0	28	10	0	0	4
2016	-	0	10	15	-	-	-	-
Total	31	64	10	59	19	57	-	24



Como los VDEN, VCHIK y el VZIK se transmiten primariamente por mosquitos *Ae. Aegypti*, podría asumirse que éstos seguirán el mismo patrón de circulación regional en la Américas. Aunque esta hipótesis se puede sustentar a escala regional se desconoce cómo este patrón de transmisión pudiera diferir entre las grandes urbanizaciones. La tendencia del VDEN es de mostrar una gran heterogeneidad entre ciudades, con algunas urbanizaciones en las que se detecta mayor seroprevalencia y transmisión que otras. Los movimientos humanos y sus patrones de agregación pueden influir en la exposición, conduciendo a una mayor interacción humano-mosquito, con rápida propagación de los arbovirus.

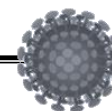
En el presente estudio se comprobó una identificación significativa ($p=0.0000$) en el número de casos positivos al VDEN los años 2013 y 2015. No obstante, se documentó que durante el 2014 concomitaron en ese país las epidemias de VCHIK con la circulación simultánea del VDEN. Autores en Venezuela, han reportado que la epidemia de VCHIK en el 2014 y del VZIK (2015-2016) han sido eventos epidemiológicos importantes que han afectado a un gran número de personas en ese país (195). Estos hallazgos resaltan la importancia del diagnóstico etiológico de los brotes de enfermedad por arbovirus. La cocirculación de ambos agentes (VDEN y VCHIK), condujo a errores en el diagnóstico clínico, pues el personal de salud en Venezuela no estaba preparado para identificar la enfermedad que este alfavirus del viejo mundo causaba después de su introducción en el continente americano (173). Lo mismo sucedió tras la introducción del VZIK, pues los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y a los que se les colectaron muestras en el 2016, se les hizo el diagnóstico clínico de dengue. Por tanto, estos resultados muestran que, aunque en ciertos pacientes pudieran identificarse algunas características clínicas específicas de la infección que estos virus producen, en la mayoría las manifestaciones clínicas se solapan (172). Esto sucede sobre todo en los estadios iniciales de la enfermedad, en los que el solo análisis clínico no permite identificar el agente etiológico específico.

En este sentido, cuando el VCHIK se introdujo en la Américas se describía la infección como una enfermedad febril autolimitada, benigna con predominio de la sintomatología articular (196, 197). Entonces, sólo el abordaje integral de los



brotes producidos por arbovirus utilizando sistemas de vigilancia robustos que permitan identificar oportunamente él o los agentes que circulan nos permitirá en primer lugar, tomar las medidas para disminuir la densidad del vector y posteriormente establecer el seguimiento correcto según grupos de riesgos específicos (por ejemplo gestantes y pacientes con enfermedades crónicas). Pero más importante aún, es que los resultados obtenidos en la presente investigación apuntan a que la circulación de un arbovirus en un área específica no excluye la posible circulación de otros agentes (VDEN/VCHIK) transmitidos por el mismo vector. Entonces, éstos son hallazgos que se deberán tener en cuenta en el momento de establecer algoritmos diagnósticos para la futura vigilancia de arbovirus.

Es importante resaltar que en ninguna de las muestras de plasma evaluadas en la presente investigación se identificó la coinfección por más de un arbovirus a pesar de haberse utilizado un protocolo múltiple de PCR en tiempo real (VDEN, VCHIK y VZIK) (Tabla 10). No obstante, las condiciones para que éstas se produjeran estaban creadas pues en el estado de Carabobo circularon de manera simultánea el VDEN y el VCHIK en el 2014. Este resultado contrasta con algunos hallazgos de autores que han reportado casos puntuales de infección por varios Arbovirus en humanos (172). Entre las coinfecciones que se han descrito se encuentran: malaria, VDEN y VCHIK en Nigeria (198); VDEN-4 y VCHIK en Angola (199); VZIK y VDEN en Nueva Caledonia (200) y en Haití (201). Aún más, Carrillo y colaboradores, detectaron la cocirculación de VDEN, VCHIK y VZIK, así como la coinfección (3/157 con VDEN/VCHIK/VZIK) en pacientes febriles residentes en la frontera de Colombia con Venezuela (202). No obstante, en este último estudio se utilizaron métodos serológicos y tres protocolos de PCR en punto final que no tienen una validación clínica. Por tanto, no se puede establecer comparaciones entre los resultados obtenidos por ellos y los que se muestran en la presente investigación. Aquí se utilizó un protocolo múltiple de PCR en tiempo real completamente diferente con otra plataforma, cuyo desempeño analítico y clínico ha sido evaluado y aprobado por la FDA para uso en el diagnóstico *in vitro* de muestras de humanos (IVD-siglas del inglés- in vitro diagnosis) (168).



Con vistas a identificar el patrón estacional de los arbovirus que se estudiaron en la presente investigación se decidió comparar el número de casos confirmados según los diferentes meses del año. Así se encontró que los VDEN y el VCHIK causaron brotes en el estado de Carabobo principalmente entre los meses de agosto y diciembre, con picos máximos en septiembre y octubre (Gráfico 2). Sin embargo, a partir de los resultados de la presente investigación no se puede describir el patrón estacional del VZIK. Esto guarda relación con que sólo se incluyeron 25 pacientes enrolados durante los meses de enero y febrero del 2016, período en el que tuvo lugar el pico epidémico del VZIK en Venezuela. Más aún, cuando se conoce que continuaron confirmándose casos de infección por VZIK durante todo el 2016 (203)

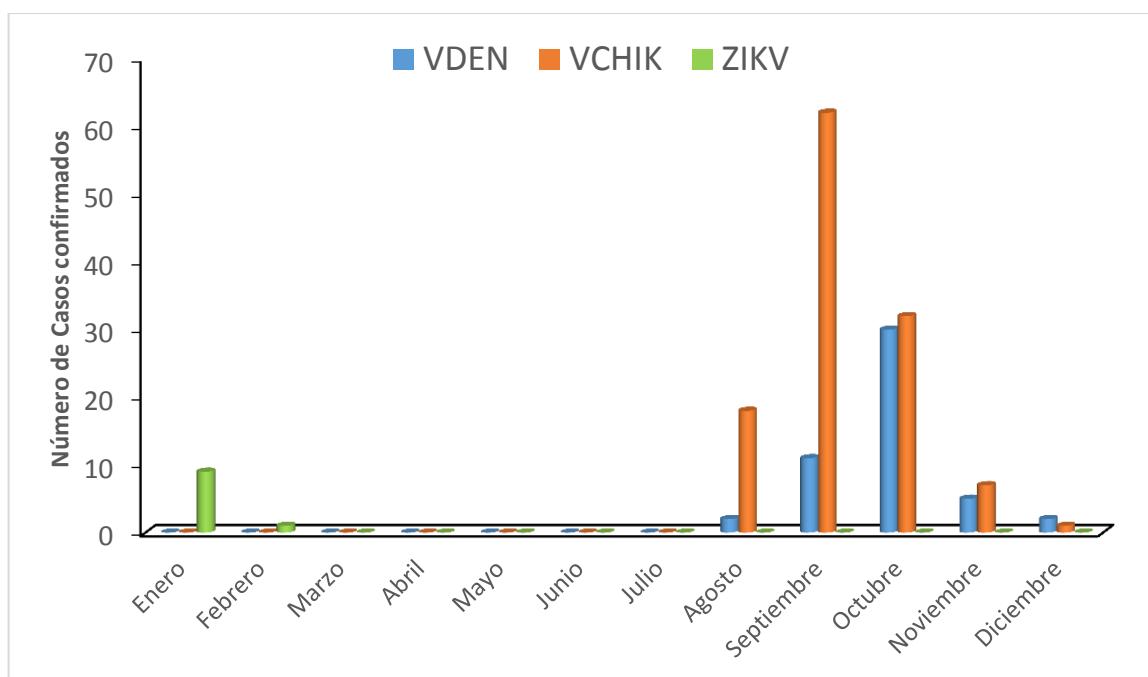
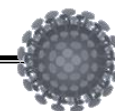


Gráfico 2. Distribución del número de casos de infección por VDEN, VCHIK y VZIK detectados mediante protocolo múltiple Trioplex rRT-PCR según el mes en el que se colectó la muestra de plasma de pacientes venezolanos con sospecha de infección por VDEN en el estado de Carabobo, Venezuela (2013-2016).

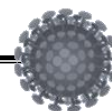
Es importante resaltar que Venezuela está bajo la influencia de un fenómeno atmosférico que se denomina zona de convergencia intertropical que afecta de forma drástica el patrón de precipitaciones anuales. De esta forma en Venezuela se identifica un período seco entre los meses de noviembre hasta abril y otro



lluvioso desde mayo hasta octubre (204). Se ha planteado que el dengue en Venezuela muestra un patrón estacional que coincide con el período de precipitaciones con un pico entre los meses de agosto y noviembre, lo que coincide con los hallazgos del presente estudio. La incidencia de dengue que se ha registrado en el estado de Carabobo en los últimos 26 años es de 88 casos por 100 000 habitantes, por lo que constituye uno de los estados de Venezuela que ha registrado el mayor número de casos de dengue (177).

Se ha hipotetizado que el dengue pudiera seguir un patrón estacional (a corto plazo) e interanual (a largo plazo) (205, 206). Desde el punto de vista estacional, la incidencia de la enfermedad se caracteriza por ciclos regulares anuales. Los factores ambientales que mayor repercusión tienen en estas variaciones son los cambios en las precipitaciones y las temperaturas, que afectan la ecología del mosquito *Aedes* y por tanto al virus. En este sentido, ambas variables influyen en: a) la tasa de reproducción y de mortalidad del mosquito, b) la frecuencia de alimentación de la hembra del mosquito *Aedes* y c) el período extrínseco de replicación viral que es el que determina la forma y el grado de exposición del hombre a la infección (207, 208).

Por otra parte, a escala interanual, en algunos escenarios epidemiológicos se observan ciclos de la enfermedad con pocos años de intervalo, siendo estas epidemias periódicas muy difíciles de describir (209, 210). En algunos estudios esos brotes periódicos se han asociado con variaciones climatológicas interanuales a escala global, tales como el fenómeno de El Niño (ENSO –siglas del inglés- El Niño Southern Oscillation) (211), pues ENSO determina cambios periódicos en las variables climáticas a nivel local. Otros factores intrínsecos que se han explorado para explicar la ocurrencia de estas epidemias periódicas son la inmunidad y susceptibilidad del hospedero (212). Finalmente, una aproximación más atinada para justificar los ciclos epidémicos interanuales sería combinar ambos mecanismos intrínsecos y extrínsecos (213). En algunos estudios se han identificado oscilaciones en la incidencia del dengue en dos ciclos a intervalos de 3-4 años y otro de 1 año, los que han dominado la dinámica de la

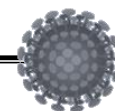


enfermedad. Sin embargo, estos ciclos han sido transitorios y con variaciones en su potencia.

En Venezuela, algunos autores han identificado que en regiones hiperendémicas existe un ciclo a largo plazo (interanual) y otro a corto plazo (estacional) en la incidencia del dengue. El ciclo interanual se ha asociado de forma significativa con ENSO, por lo que se ha sugerido que los eventos de "El Niño" han sido responsables, en parte, de los brotes periódicos de dengue en el norte de Venezuela. El mecanismo que se ha propuesto para asociar este efecto de ENSO es mediante temperaturas más cálidas con escasas precipitaciones. Los ciclos interanuales más fuertes y significativos con picos de intervalo entre 3-4 años en frecuencia han sido más marcados en el estado de Carabobo después del 2006-2007, lo que coincide con el mayor brote de dengue en ese período.

En Venezuela, los sitios de cría potenciales relacionados con la vivienda (llantas usadas, basureros) constituyen un riesgo para la transmisión del dengue durante la etapa de lluvia. Aún más, la ausencia del servicio de agua potable ha provocado un comportamiento cada vez más frecuente que obliga a los humanos a almacenar agua dentro y fuera de los domicilios (214), fundamentalmente en las etapas de sequía (215). En consecuencia, es en las áreas con deficiencias en los servicios públicos o durante los años de sequía (e.g "El Niño") en las que sucede una transmisión perenne del dengue.

Por el contrario, en Ecuador se ha identificado que el mayor número de casos de dengue aparecen en localidades pobres que tienen acceso a servicio de agua en el interior de las viviendas (comunidades bien establecidas con infraestructura de urbanización) (216). Estos hallazgos contradictorios se explican por la costumbre de los individuos a almacenar agua en contenedores en el patio como fuentes secundarias de agua, que se utilizan sólo cuando se les interrumpe el servicio. Éstos contenedores no se cubren y por tanto constituyen el sitio ideal para que habiten las larvas del *A. aegypti* durante la etapa de lluvias. En contraste, en aquellas comunidades de Ecuador en las que no hay servicio de agua en el domicilio el almacenaje se realiza en contenedores que constituyen fuentes



primarias de abasto. Esto conlleva a que se llenen y vacíen continuamente, lo que previene que se desarrollen las larvas y con ello los mosquitos adultos.

Entonces, de todo lo anterior se comprende la complejidad de las interacciones entre factores virales, del medio ambiente y del hospedero que determinan la transmisión de los arbovirus en nuestras comunidades. Pero lo más importante, es que a nivel local éstas pueden comportarse de una forma diferente. Por tanto, si se pretende reducir la transmisión de los arbovirus durante los períodos epidémicos e interepidémicos habría que focalizar las medidas de control en aquellas zonas de alto riesgo a nivel de vecindarios o barrios más que las intervenciones realizadas al azar. Sería oportuno entonces generar mapas de riesgo que permita identificar los "puntos calientes" (áreas de elevada transmisión) en dichas localidades para focalizar en ellos las acciones y hacia ellos destinar los recursos necesarios para detener su circulación.

En la tabla 10 se muestra la distribución de los serotipos del VDENV que según el año en el que se identificó la infección mediante el protocolo de PCR-TR para VDENV-1-4 de los CDC. Así se detectó una mayor frecuencia de infección por VDENV-2 (62%), seguida por VDENV-3 (14%), y en igual frecuencia VDENV-4 (12%) y VDENV-1 (12%). Se identificó la circulación autóctona del VDENV-2 en el estado de Carabobo durante los tres años en los que se ejecutó la vigilancia centinela del presente estudio, lo que podría relacionarse con una mejor adaptación de este virus al vector en esta zona geográfica. Por el contrario, no se identificó la circulación de VDENV-1, 3 y 4 durante el 2014, lo que pudiera guardar relación con la introducción del VCHIK que fue el responsable de una gran epidemia en Venezuela en ese mismo año.

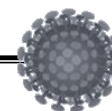
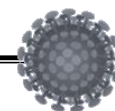


Tabla 10. Distribución de los serotipos del VDENV que se detectaron mediante el protocolo de PCR-TR para VDEN-1-4 de los CDC en muestras de plasma colectadas en el estado de Carabobo, Venezuela (2013-2016).

Año de colecta	Serotipos de VDEN			
	VDEN-1	VDEN-2	VDEN-3	VDEN-4
2013	2	1	1	3
2014	-	5	0	0
2015	4	25	6	3
Total	6	31	7	6

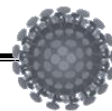
Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con hallazgos de otros autores (217, 218), que resaltan la hiperendemicidad de los VDEN en Venezuela. En 1964 ocurrieron los primeros brotes de dengue que se hayan registrado en ese país. Éstos se atribuyeron a la reintroducción de serotipos no circulantes de VDEN lo que coincidió con el incremento en la densidad y diseminación de *Aedes aegypti* por todo el país (219, 220). Sin embargo, a partir del 2000 los cuatro serotipos del complejo dengue cocirculan en Venezuela (221). No obstante, el mayor pico epidémico se registró en el 2001 y aunque se relacionó con la introducción del serotipo 3 del VDEN, éste evento también coincidió con el evento de "La Niña" (efecto opuesto a "El Niño" con temperaturas más frías y anomalías en las precipitaciones) (222). Aún más, después del año 2000, al menos tres grandes epidemias tuvieron lugar en Venezuela en las que cocircularon todos los serotipos del VDEN en el mismo período. En investigaciones futuras, habría que explorar las posibles interacciones entre las variables climatológicas, características del vector, los marcadores virales y los factores del hospedero que favorecen la circulación de los diferentes virus del complejo dengue en Venezuela.



Para analizar el comportamiento y distribución de la infección por los diferentes serotipos del VDEN en el continente americano habría que revisar diferentes estudios que se han realizado en el cono sur como por ejemplo Argentina (178, 179, 223), Chile (180) y Paraguay (11) en los que se ha reportado la circulación de los serotipos 1 y 3 de los virus del complejo dengue. No obstante, existen evidencias de identificación de los cuatro serotipos en esa región (224). Mediante análisis filogenéticos realizados recientemente en Ecuador, se demostró que existe un ancestro común entre los VDEN 1, 2 y 4 identificados en ese país con los aislados en Venezuela y Colombia, indicando la presencia de un flujo de intercambio de virus entre dichos países (225). Por su parte en la región del Caribe se han reportado estudios en Cuba (19), República Dominicana (226, 227) y Puerto Rico (228, 229) en los que se ha identificado la circulación de los cuatro serotipos del VDEN en el 2002, 2007 y 2010.

El VDEN-1 fue responsable de la enfermedad en niños y adultos jóvenes en el 2007 y circuló junto con VDEN-4 entre el 2003 y 2004 en la región del Caribe. Por su parte, el VDEN-2 ha sido el que ha circulado de forma persistente al confirmarse casos de infección por este virus todos los años en la región del Caribe (230), lo que coincide con los resultados de la presente investigación. En Puerto Rico, este serotipo ha circulado de manera continua durante 25 años. No obstante, desde 1999 hasta el 2003 fue uno de los períodos en los que hubo una baja circulación del VDEN-2. Por su parte, el VDEN-3 emergió en 1998 tras 21 años de ausencia, seguido por un período de rápida expansión que se asoció con una disminución gradual del resto de los serotipos por un período de siete años, antes de disminuir su circulación a niveles no detectables en el 2008 (231). Los factores que ocasionaron la expansión y el colapso en la circulación del VDEN-3 se han atribuido a una gran diversidad genética de este virus junto con la existencia de un elevado número de individuos susceptibles (230).

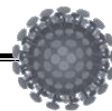
De forma general, la cocirculación de los cuatro serotipos del VDEN también se ha reportado en países como Guatemala, Nicaragua, México, Martinica, Guadalupe, Colombia, Guyana Francesa, Perú, Brasil y Argentina. Sin embargo, se conoce que muchos países no reportan a la OPS las cifras reales de todos los casos de



dengue que se producen anualmente en sus países (29, 174, 230). Esto obstaculiza la evaluación real del impacto de esta enfermedad en la región, limitando incluso su contención, vigilancia y por tanto los efectos que la introducción de estos agentes tiene en población que poseen inmunidad previa a otros serotipos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

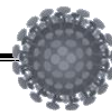


CONCLUSIONES

- La causa más frecuente de enfermedad similar a dengue en el estado de Carabobo de Venezuela fue el VCHIK, seguido en orden de frecuencia por el VDEN y VZIKV.
- Los virus del complejo dengue y el VCHIK poseen un patrón de circulación estacional durante el período de agosto a diciembre, con picos máximos en el número de casos durante los meses de septiembre y octubre.
- Aunque se comprueba que en Venezuela circulan los cuatro serotipos del complejo dengue, el VDEN-2 es el responsable del mayor número de los casos que se reportan anualmente.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

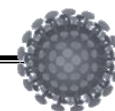


RECOMENDACIONES

- Identificar el genotipo infectante de los arbovirus detectados en las muestras de plasma incluidas en el presente estudio.
- Solicitar la información clínica, virológica y epidemiológica que se colectó como parte del proyecto IDAMS con vistas a esclarecer algunas de las interrogantes que surgieron como parte del análisis de los datos.

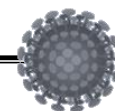
CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

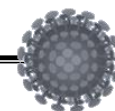


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

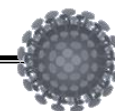
1. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta tropica*. 2017;166:155-63.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
3. WHO. Zika: We must be ready for the long haul WHO: WHO; 2017 [cited 2017 1 February 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/2017/zika-long-haul/en/>.
4. Ribera A, Degasne I, Jaffar Bandjee MC, Gasque P. [Chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection: clinical description and therapeutic considerations]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*. 2012;72 Spec No:83-5.
5. Aguirre AA, McLean RG, Cook RS, Quan TJ. Serologic survey for selected arboviruses and other potential pathogens in wildlife from Mexico. *Journal of wildlife diseases*. 1992;28(3):435-42.
6. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):557-61.
7. Rubin EJ, Greene MF, Baden LR. Zika Virus and Microcephaly. *The New England journal of medicine*. 2016;374(10):984-5.
8. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet*. 2014;383(9916):514.
9. Tami A. Venezuela: violence, human rights, and health-care realities. *Lancet*. 2014;383(9933):1968-9.
10. Wang SF, Wang WH, Chang K, Chen YH, Tseng SP, Yen CH, et al. Severe Dengue Fever Outbreak in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(1):193-7.
11. Giménez V, Picagua E, Carpinelli M, Rovira C, Ferreira L. Hallazgos laboratoriales y referencia sintomatológica en población pediátrica durante la epidemia de dengue del año 2007. *Pediatría (Asunción)*. 2011;38(1):12-6.
12. Reyes M, Mercado JC, Standish K, Matute JC, Ortega O, Moraga B, et al. Index cluster study of dengue virus infection in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(3):683-9.
13. Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, et al. Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2357.
14. Kalawat U, Sharma KK, Reddy SG. Prevalence of dengue and chikungunya fever and their co-infection. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2011;54(4):844-6.
15. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):381-2.



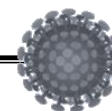
16. Perez MA, Gordon A, Sanchez F, Narvaez F, Gutierrez G, Ortega O, et al. Severe coinfections of dengue and pandemic influenza A H1N1 viruses. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(11):1052-5.
17. Gutierrez G, Standish K, Narvaez F, Perez MA, Saborio S, Elizondo D, et al. Unusual dengue virus 3 epidemic in Nicaragua, 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(11):e1394.
18. Instituto Nacional de Estadística: Venezuela; 2001 [cited 20/6/2018]. Available from: <http://www.ine.gov.ve/>.
19. Posada P, Ferrer Y, Rodríguez I. Caracterización epidemiológica del dengue en Ciego de Ávila. *MEDICIEGO*. 2010;16(1).
20. Yamshchikov G, Borisevich V, Kwok CW, Nistler R, Kohlmeier J, Seregin A, et al. The suitability of yellow fever and Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus. *Vaccine*. 2005;23(39):4785-92.
21. Monsalve N, Rubio-Palis Y, Pérez E. Modelaje Bayesiano espacio-temporal de factores asociados con la incidencia del dengue en el área metropolitana de Maracay, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2010;L(2):219-32.
22. Hassing RJ, Leparac-Goffart I, Tolou H, van Doornum G, van Genderen PJ. Cross-reactivity of antibodies to viruses belonging to the Semliki forest serocomplex. *Euro Surveill*. 2010;15(23).
23. Calisher CH, el-Kafrawi AO, Al-Deen Mahmud MI, Travassos da Rosa AP, Bartz CR, Brummer-Korvenkontio M, et al. Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *J Clin Microbiol*. 1986;23(1):155-9.
24. Adibi JJ, Marques ET, Jr., Cartus A, Beigi RH. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet*. 2016;387(10027):1587-90.
25. OMS. Microcefalia - archivos de brotes epidémicos. 16 de febrero de 2018 [cited 28/6/2018]. Available from: <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/microcephaly/es/>.
26. Batista PM, Andreotti R, Almeida PS, Marques AC, Rodrigues SG, Chiang JO, et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(6):684-90.
27. **Vincenti-Gonzalez MF, Grillet ME, Velasco-Salas ZI, Lizarazo EF, Amarista MA, Sierra GM, et al. Spatial Analysis of Dengue Seroprevalence and Modeling of Transmission Risk Factors in a Dengue Hyperendemic City of Venezuela. 2017;11(1):e0005317.**
28. OPS/OMS. Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2013-2014. Washington, D.C. [updated 29 de diciembre del 2014]. Available from: www.paho.org.
29. Ramos-Castaneda J, Barreto Dos Santos F, Martinez-Vega R, Galvao de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(1):e0005224.
30. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016;29(3):487-524.
31. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003;27(1):1-13.
32. Bhattacharya MK, Maitra S, Ganguly A, Bhattacharya A, Sinha A. Dengue: A Growing Menace -- A Snapshot of Recent Facts, Figures & Remedies. *Int J Biomed Sci*. 2013;9(2):61-7.
33. Sabin AB. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev*. 1950;14(3):225-32.
34. Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians*. 1960;73:140-55.



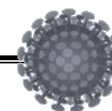
35. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952;Vol. 46(5):509-20.
36. Baraka V, Kweka EJ. The Threat of Zika Virus in Sub-Saharan Africa – The need to Remain Vigilant. *Front Public Health*. 2016;4.
37. Messina JP, Kraemer MU, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss DJ, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *eLife*. 2016;5.
38. Enserink M. Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. *Science*. 2006;311(5764):1085.
39. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 2):471-9.
40. Vanlandingham DL, Tsetsarkin K, Klingler KA, Hong C, McElroy KL, Lehane MJ, et al. Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(4):663-9.
41. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis*. 2016;63(12):1584-90.
42. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960;131(3407):1102-3.
43. AbuBakar S, Sam IC, Wong PF, MatRahim N, Hooi PS, Roslan N. Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(1):147-9.
44. Salazar-Gonzalez JA, Angulo C, Rosales-Mendoza S. Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine*. 2015;33(31):3650-8.
45. Mlera L, Melik W, Bloom ME. The role of viral persistence in flavivirus biology. *Pathog Dis*. 2014;71(2):137-63.
46. Qing Y, Zhong Y, Jian-Feng H, Tao J, Xiao-Feng L, Cheng-Feng Q. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection Genetics and Evolution*. 2016;43:43-9.
47. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology*. 2016;13.
48. Bharucha T, Breuer J. Review: A neglected Flavivirus: an update on Zika virus in 2016 and the future direction of research. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2016;42:317–25.
49. Junjhon J, Lausumpao M, Supasa S, Noisakran S, Songjaeng A, Saraithong P, et al. Differential Modulation of prM Cleavage, Extracellular Particle Distribution, and Virus Infectivity by Conserved Residues at Nonfurin Consensus Positions of the Dengue Virus pr-M Junction. *J Virol*. 2008;82(21):10776-91.
50. Ekins S, Liebler J, Neves BJ, Lewis WG, Coffee M, Bienstock R, et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus. *F1000Res*. 2016;5.
51. Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 12):3075-84.
52. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology*. 2009;4(7):837-56.
53. Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol*. 1984;51(1):254-8.



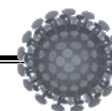
54. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 2010;468(7324):709-12.
55. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol*. 2010;84(20):10877-87.
56. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol*. 2011;2011:249640.
57. Xu X, Song H, Qi J, Liu Y, Wang H, Su C, et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J*. 2016;35(20):2170-8.
58. Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. *Flavivirus*. *Fields Virology*. I. 6ta ed. Filadelfia 2013. p. 712-47.
59. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathog*. 2009;5(10).
60. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53.
61. Perera R, Kuhn RJ. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):369-77.
62. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25.
63. Crill WD, Trainor NB, Chang GJJ. A detailed mutagenesis study of flavivirus crossreactive epitopes using West Nile virus-like particles. *Journal of General Virology*. 2007;88:1169-74.
64. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of Binding of Dengue Virus Envelope Protein to Target Cells. *Journal of Virology*. 1996;70(12):8765-72.
65. Chakraborty S. MEPPitope: spatial, electrostatic and secondary structure perturbations in the post-fusion Dengue virus envelope protein highlights known epitopes and conserved residues in the Zika virus. *F1000Res*. 2016;5.
66. Crabtree MB, Kinney RM, Miller BR. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol*. 2005;150:771-86.
67. Wu CF, Wang SH, Sunc CM, Hub ST, Syua WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *Journal of Virological Methods*. 2003;114:45-54.
68. Tambunan US, Alamudi S. Designing cyclic peptide inhibitor of dengue virus NS3-NS2B protease by using molecular docking approach. *Bioinformation* 2010;5(6):250-4.
69. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *PNAS*. 2010;107(39):16922-27.
70. Jain R, Coloma J, García-Sastre A, Aggarwal AK. Structure of the NS3 helicase from Zika virus. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2016;23(8):752-4.
71. Munoz- Jordan JL, Laurent- Rolle M, Ashour J. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of Virology*. 2005;79:8004- 13.
72. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside -2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal*. 2002;21(11):2757-68.



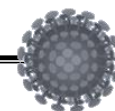
73. Barral K, Sallamand C, Petzold C, Coutard B, Collet A, Thillier Y, et al. Development of specific dengue virus 2'-O- and N7-methyltransferase assays for antiviral drug screening. *Antiviral Res.* 2013;99(3):292-300.
74. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin - 8 transcription and secretion. *Journal of Virology.* 2005;79:11053- 61.
75. Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9).
76. Paredes AM, Brown DT, Rothnagel R, Chiu W, Schoepp RJ, Johnston RE, et al. Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(19):9095-9.
77. Kuhn RJ. *Togaviridae: the viruses and their replication.* Fields virology, 5th ed, vol 1 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007:1001–22.
78. Kielian M, Chanel-Vos C, Liao M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 2010;2(4):796-825.
79. Selvamani SP, Mishra R, Singh SK. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. *PLoS One.* 2014;9(8):e103624.
80. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators of inflammation.* 2011;2011:296069.
81. Dudha N, Rana J, Rajasekharan S, Gabrani R, Gupta A, Chaudhary VK, et al. Host-pathogen interactome analysis of Chikungunya virus envelope proteins E1 and E2. *Virus genes.* 2015;50(2):200-9.
82. Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature.* 2010;468(7324):705-8.
83. Choi HK, Tong L, Minor W, Dumas P, Boege U, Rossmann MG, et al. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature.* 1991;354(6348):37-43.
84. Elgizoli M, Dai Y, Kempf C, Koblet H, Michel MR. Semliki Forest virus capsid protein acts as a pleiotropic regulator of host cellular protein synthesis. *Journal of virology.* 1989;63(7):2921-8.
85. Aguilar PV, Weaver SC, Basler CF. Capsid protein of eastern equine encephalitis virus inhibits host cell gene expression. *Journal of virology.* 2007;81(8):3866-76.
86. WILKINS LW. *F I E L D S Virology S I X T H E D I T I O N* 2013.
87. Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology.* 1992;73 (Pt 8):2129-34.
88. Schluckebier G, O'Gara M, Saenger W, Cheng X. Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *Journal of molecular biology.* 1995;247(1):16-20.
89. Martin JL, McMillan FM. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current opinion in structural biology.* 2002;12(6):783-93.
90. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen A, et al. Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *Journal of virology.* 2000;74(15):6725-33.
91. Lampio A, Kilpelainen I, Pesonen S, Karhi K, Auvinen P, Somerharju P, et al. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(48):37853-9.
92. Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kaariainen L, Ahola T. Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *Journal of virology.* 2007;81(2):872-83.



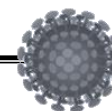
93. Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kaariainen L. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. The Journal of biological chemistry. 2000;275(23):17281-7.
94. Hahn YS, Strauss EG, Strauss JH. Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. Journal of virology. 1989;63(7):3142-50.
95. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. Journal of virology. 1991;65(2):985-8.
96. Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. J Virol. 2012;86(13):7180-91.
97. Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. Journal of virology. 2006;80(12):5686-96.
98. Frolov I, Agapov E, Hoffman TA, Jr., Pragai BM, Lippa M, Schlesinger S, et al. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. Journal of virology. 1999;73(5):3854-65.
99. Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. Journal of virology. 2007;81(5):2472-84.
100. Lastarza MW, Grakoui A, Rice CM. Deletion and duplication mutations in the C-terminal nonconserved region of Sindbis virus nsP3: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. Virology. 1994;202(1):224-32.
101. De I, Fata-Hartley C, Sawicki SG, Sawicki DL. Functional analysis of nsP3 phosphoprotein mutants of Sindbis virus. Journal of virology. 2003;77(24):13106-16.
102. Tuittila M, Hinkkanen AE. Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. The Journal of general virology. 2003;84(Pt 6):1525-33.
103. Davis NL, Willis LV, Smith JF, Johnston RE. In vitro synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: analysis of a viable deletion mutant. Virology. 1989;171(1):189-204.
104. Galbraith SE, Sheahan BJ, Atkins GJ. Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. The Journal of general virology. 2006;87(Pt 4):937-47.
105. Peranen J, Takkinen K, Kalkkinen N, Kaariainen L. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. The Journal of general virology. 1988;69 (Pt 9):2165-78.
106. Li GP, La Starza MW, Hardy WR, Strauss JH, Rice CM. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. Virology. 1990;179(1):416-27.
107. Foy NJ, Akhrymuk M, Akhrymuk I, Atasheva S, Bopda-Waffo A, Frolov I, et al. Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. Journal of virology. 2013;87(4):1997-2010.
108. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. The Journal of general virology. 2015;96(9):2483-500.
109. Vázquez AG. Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles: análisis moleculares del virus west nile y otros flavivirus [Tesis en opción del grado de Doctor en Ciencias]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.
110. OPS/OMS. Zika - Actualización Epidemiológica Washington, D.C. [updated Abril 2017]. Available from: www.paho.org.



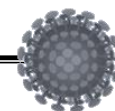
111. Goo L, Dowd KA, Smith ARY, Pelc RS, DeMaso CR, Pierson TC. Zika Virus Is Not Uniquely Stable at Physiological Temperatures Compared to Other Flaviviruses. *mBio*. 2016;7(5).
112. Tang B, Xiao Y, Wu J. Implication of vaccination against dengue for Zika outbreak. *Sci Rep*. 2016;6.
113. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*. 1994;58(3):491-562.
114. Ludwig GV, Iacono-Connors LC. Insect-transmitted vertebrate viruses: flaviviridae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1993;29A(4):296-309.
115. J P. Antibody dependent enhancement of viral infectivity. *Advances in virus research*. 1986:335-52.
116. Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun*. 1981;32(2):469-73.
117. WHO. Scientific Working Group on Dengue. Meeting Report. 3-5 April; Geneva: TDR/DEN/SWG/001; 2000.
118. GOLLINS SW, Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. *Nature*. 1986;321:244-6.
119. Cardosa MJ, Porterfield JS, Gordon S. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. *J Exp Med*. 1983;158:258-63.
120. da Silva SR, Gao SJ. Zika Virus: An Update on Epidemiology, Pathology, Molecular Biology, and Animal Model. *J Med Virol*. 2016;88(8):1291-6.
121. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-96.
122. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006;80(23):11418-31.
123. Gollins SW, Porterfield JS. pH-dependent Fusion between the Flavivirus West Nile and Liposomal Model Membranes *J gen Virol*. 1986;67:157-66.
124. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. 1997;3(8):866-71.
125. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the Treatment of Infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):67-82.
126. Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol*. 1990;110(1-2):91-101.
127. Hill A LM, Blanden R. The Cellular Immune Response to Flaviviruses. *Viruses and Cellular Immune Response*. 1993:263-87.
128. Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2013;99(3):345-70.
129. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA. Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(4):1147-66.
130. Ios S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*. 2014;44(7):302-7.
131. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536-43.
132. Garcia-Bujalance S, Gutierrez-Arroyo A, De la Calle F, Diaz-Menendez M, Arribas JR, Garcia-Rodriguez J, et al. Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases. *J Clin Virol*. 2017;96:110-5.



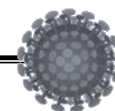
133. Krow-Lucal ER, Biggerstaff BJ, Staples JE. Estimated Incubation Period for Zika Virus Disease. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(5):841-5.
134. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7.
135. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2007;7(5):319-27.
136. Paixao ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ global health*. 2018;3(Suppl 1):e000530.
137. Control. CoD. Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya and dengue viruses. 2016.
138. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):84-6.
139. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet*. 2016;387(10030):1811-2.
140. Lee AJ, Bhattacharya R, Scheuermann RH, Pickett BE. Identification of diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-borne Flaviviruses. 2017;12(5):e0178199.
141. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.
142. OPS/OMS. Vigilancia del virus Zika (ZIKV) en las Américas: Detección y diagnóstico por laboratorio Washington D.C. [updated 2015]. Available from: www.paho.org.
143. Rodhain F. [Arboviruses also have an American dream]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990). 2017;110(3):147-59.
144. Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog*. 2007;3(5):e75.
145. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009;9(4):523-40.
146. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*. 1999;286(5448):2333-7.
147. Slavov S, Otaguiri K, Kashima S, Covas D. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(5).
148. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):860-7.
149. Torres JR, Echezuria L, Fernandez M, Riskey A. Epidemiology and Disease Burden of Pediatric Dengue in Venezuela. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2015.
150. Elsinga J, Lizarazo EF, Vincenti MF, Schmidt M, Velasco-Salas ZI, Arias L, et al. Health Seeking Behaviour and Treatment Intentions of Dengue and Fever: A Household Survey of Children and Adults in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(12):e0004237.
151. Torres JR, Leopoldo Codova G, Castro JS, Rodriguez L, Saravia V, Arvelaez J, et al. Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. *IDCases*. 2015;2(1):6-10.
152. Organization P-AH. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2016. 2016.
153. JF OL. Evolución de la epidemia de Zika en Venezuela, hasta el 21 de marzo de 2016. *Gaceta medica de Caracas*. 2016;124(1):50-6.
154. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2311.



155. Watrin L, Ghawche F, Larre P, Neau JP, Mathis S, Fournier E. Guillain–Barre´ Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(14).
156. OPS/OMS. Casos acumulados Zika Washington, D.C. [updated Enero 2018]. Available from: www.paho.org.
157. OPS/OMS. Zika-Epidemiological Report: Venezuela Washington, D.C. [updated Septiembre 2017]. Available from: www.paho.org.
158. Hotez PJ, Basanez MG, Acosta-Serrano A, Grillet ME. Venezuela and its rising vector-borne neglected diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005423.
159. Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, Silva-Caso W, Suarez-Ognio L, Weilg P, et al. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. 2017;12(11):e0187897.
160. Sanchez-Carbonel J, Tantalean-Yopez D, Aguilar-Luis MA, Silva-Caso W, Weilg P, Vasquez-Achaya F, et al. Identification of infection by Chikungunya, Zika, and Dengue in an area of the Peruvian coast. Molecular diagnosis and clinical characteristics. *BMC research notes*. 2018;11(1):175.
161. Hotez PJ, Murray KO. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):e0005462.
162. Culquichicon C, Cardona-Ospina JA, Patino-Barbosa AM, Rodriguez-Morales AJ. Bibliometric analysis of Oropouche research: impact on the surveillance of emerging arboviruses in Latin America. 2017;6:194.
163. Sakkas H, Bozidis P, Franks A. Oropouche Fever: A Review. 2018;10(4).
164. Smith JL, Pugh CL, Cisney ED, Keasey SL, Guevara C, Ampuero JS, et al. Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages. *mSphere*. 2018;3(2).
165. Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e787.
166. Vasconcelos PF, Calisher CH. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY)*. 2016;16(5):295-301.
167. Colmant AMG, Hobson-Peters J, Bielefeldt-Ohmann H, van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Chow WK, et al. A New Clade of Insect-Specific Flaviviruses from Australian Anopheles Mosquitoes Displays Species-Specific Host Restriction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;2(4).
168. Santiago GA, Vazquez J, Courtney S, Matias KY, Andersen LE, Colon C, et al. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nature communications*. 2018;9(1):1391.
169. Weiler AM, Barry GL, Mohns MS, Breitbart ME, Stewart LM, Buechler CR, et al. Zika plasma viral dynamics in nonhuman primates provides insights into early infection and antiviral strategies. *Nature communications*. 2017.
170. Landry ML, St George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(1):60-7.
171. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013;158(7):1445-59.
172. Paniz-Mondolfi AE, Rodriguez-Morales AJ, Blohm G, Marquez M, Villamil-Gomez WE. ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(1):42.
173. Vincenti-Gonzalez MF, Tami A, Lizarazo EF, Grillet ME. ENSO-driven climate variability promotes periodic major outbreaks of dengue in Venezuela. 2018;8(1):5727.



174. Vincenti-Gonzalez MF, Grillet ME, Velasco-Salas ZI, Lizarazo EF, Amarista MA, Sierra GM, et al. Spatial Analysis of Dengue Seroprevalence and Modeling of Transmission Risk Factors in a Dengue Hyperendemic City of Venezuela. *Journal of tropical medicine*. 2017;11(1):e0005317.
175. Valero N. [Zika virus: Another emerging arbovirus in Venezuela?]. *Investigacion clinica*. 2015;56(3):241-2.
176. Oletta JF, Orihuela RA, Pulido P, Walter C. Venezuela: violence, human rights, and health-care realities. *Lancet*. 2014;383(9933):1967.
177. Venezuela. Ministerio del Poder Popular de Planificación. 2014 [cited Junio 2018]. Available from: <http://www.mppp.gob.ve/#>.
178. Seijo A, Romer Y, Espinosa M, Monroig J, Giamperetti S, Ameri D, et al. [Outbreak of indigenous dengue in the Buenos Aires Metropolitan Area. Experience of the F. J. Muniz Hospital]. *Medicina*. 2009;69(6):593-600.
179. Bernardini Zambrini DA. Neglected lessons from the 2009 dengue epidemic in Argentina. *Revista de saude publica*. 2011;45(2):428-31.
180. Perret C, Abarca K, Ovalle J, Ferrer P, Godoy P, Olea A, et al. Dengue-1 virus isolation during first dengue fever outbreak on Easter Island, Chile. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(11):1465-7.
181. Torres JR, Falleiros-Arlant LH, Duenas L, Pleitez-Navarrete J, Salgado DM, Castillo JB. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *Int J Infect Dis*. 2016;51:85-8.
182. Rossini G, Gaibani P, Vocale C, Finarelli AC, Landini MP. Increased number of cases of Chikungunya virus (CHIKV) infection imported from the Caribbean and Central America to northern Italy, 2014. *Epidemiol Infect*. 2016;144(9):1912-6.
183. Fernandez-Garcia MD, Bangert M, de Ory F, Potente A, Hernandez L, Lasala F, et al. Chikungunya virus infections among travellers returning to Spain, 2008 to 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(36).
184. Bocanegra C, Anton A, Sulleiro E, Pou D, Salvador F, Roure S, et al. Imported cases of Chikungunya in Barcelona in relation to the current American outbreak. *Journal of travel medicine*. 2016;23(3).
185. Camacho D, Reyes J, Negredo A, Hernandez L, Sanchez-Seco M, Comach G. Asian genotype of Chikungunya virus circulating in Venezuela during 2014. *Acta Trop*. 2017;174:88-90.
186. Rodriguez-Morales AJ, Haque U, Ball J, Garcia-Loaiza CJ, Galindo-Marquez ML, Sabogal-Roman JA, et al. Spatial distribution of Zika virus infection in Northeastern Colombia. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*. 2017;25(3):241-6.
187. Liu L, Wu W, Zhao X, Xiong Y, Zhang S, Liu X, et al. Complete Genome Sequence of Zika Virus from the First Imported Case in Mainland China. 2016;4(2).
188. Yin Y, Xu Y, Su L, Zhu X, Chen M, Zhu W, et al. Epidemiologic investigation of a family cluster of imported ZIKV cases in Guangdong, China: probable human-to-human transmission. *Emerging microbes & infections*. 2016;5(9):e100.
189. Liao Y, Zeng ZL, Hu GL, Yang JP, Yuan H, Li JH, et al. [Survey of the first case of Zika virus disease in the mainland of China]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2016;37(5):593-6.
190. Zhang F, Wang HJ, Wang Q, Liu ZY, Yuan L, Huang XY, et al. American Strain of Zika Virus Causes More Severe Microcephaly Than an Old Asian Strain in Neonatal Mice. *EBioMedicine*. 2017;25:95-105.
191. Ventura CV, Fernandez MP, Gonzalez IA, Rivera-Hernandez DM, Lopez-Alberola R, Peinado M, et al. First Travel-Associated Congenital Zika Syndrome in the US: Ocular and Neurological



Findings in the Absence of Microcephaly. Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina. 2016;47(10):952-5.

192. Yepez JB, Murati FA, Pettito M, Penaranda CF, de Yepez J, Maestre G, et al. Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Syndrome in Colombia and Venezuela. JAMA ophthalmology. 2017.

193. Oliveira Souto I, Alejo-Cancho I, Gascon Brustenga J, Peiro Mestres A, Munoz Gutierrez J, Martinez Yoldi MJ. Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2018;36(1):21-3.

194. Blohm GM, Lednicky JA, Marquez M, White SK, Loeb JC, Pacheco CA, et al. Complete Genome Sequences of Identical Zika virus Isolates in a Nursing Mother and Her Infant. Genome Announc. 2017;5(17).

195. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. Annual review of medicine. 2018;69:395-408.

196. Couderc T, Lecuit M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. Antiviral Res. 2015;121:120-31.

197. Simon F, Parola P, Grandadam M, Fourcade S, Oliver M, Brouqui P, et al. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. Medicine (Baltimore). 2007;86(3):123-37.

198. Raut CG, Rao NM, Sinha DP, Hanumaiah H, Manjunatha MJ. Chikungunya, dengue, and malaria co-infection after travel to Nigeria, India. Emerg Infect Dis. 2015;21(5):908-9.

199. Parreira R, Centeno-Lima S, Lopes A, Portugal-Calisto D, Constantino A, Nina J. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. Euro Surveill. 2014;19(10).

200. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. Emerg Infect Dis. 2015;21(2):381-2.

201. Iovine NM, Lednicky J, Cherabuddi K, Crooke H, White SK, Loeb JC, et al. Coinfection With Zika and Dengue-2 Viruses in a Traveler Returning From Haiti, 2016: Clinical Presentation and Genetic Analysis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016.

202. Carrillo-Hernandez MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gomez-Rangel SY, Martinez-Gutierrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. 2018;18(1):61.

203. McGough SF, Brownstein JS, Hawkins JB, Santillana M. Forecasting Zika Incidence in the 2016 Latin America Outbreak Combining Traditional Disease Surveillance with Search, Social Media, and News Report Data. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(1):e0005295.

204. Pulwarty RS, Barry RG, Riehl H. Annual and seasonal patterns of rainfall variability over Venezuela. Erdkunde. 1992;46(3):273-89.

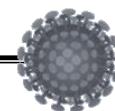
205. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. The Lancet Infectious diseases. 2002;2(1):33-42.

206. Fernández-Niño J, Cárdenas-Cárdenas L, Hernández-Ávila J, Palacio-Mejía L, Castañeda-Orjuela C. Análisis exploratorio de ondículas de los patrones de estacionalidad del dengue en Colombia. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud. 2016;36(2):44-55.

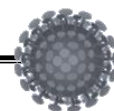
207. Morin CW, Comrie AC, Ernst K. Climate and Dengue Transmission: Evidence and Implications. Environ Health Perspect. 2013.

208. Ebi K, Nealon J. Dengue in a changing climate. Environmental Research. 2016;151:115-23.

209. Cuong HQ, Vu NT, Cazelles B, Boni MF, Thai KT, Rabaa MA, et al. Spatiotemporal dynamics of dengue epidemics, southern Vietnam. Emerg Infect Dis. 2013;19(6):945-53.



210. van Panhuis WG, Choisy M, Xiong X, Chok NS, Akarasewi P, Iamsirithaworn S, et al. Region-wide synchrony and traveling waves of dengue across eight countries in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(42):13069-74.
211. Tipayamongkholgul M, Fang CT, Klinchan S, Liu CM, King CC. Effects of the El Niño-southern oscillation on dengue epidemics in Thailand, 1996-2005. *BMC public health*. 2009;9:422.
212. Adams B, Holmes EC, Zhang C, Mammen MP, Jr., Nimmannitya S, Kalayanarooj S, et al. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14234-9.
213. Wearing HJ, Rohani P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(31):11802-7.
214. Vincenti-Gonzalez MF, Grillet ME, Velasco-Salas ZI, Lizarazo EF, Amarista MA, Sierra GM, et al. Spatial Analysis of Dengue Seroprevalence and Modeling of Transmission Risk Factors in a Dengue Hyperendemic City of Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1).
215. Adde A, Roucou P, Mangeas M, Ardillon V, Desenclos JC, Rousset D, et al. Predicting Dengue Fever Outbreaks in French Guiana Using Climate Indicators. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4).
216. Stewart-Ibarra AM, Munoz AG, Ryan SJ, Ayala EB, Borbor-Cordova MJ, Finkelstein JL, et al. Spatiotemporal clustering, climate periodicity, and social-ecological risk factors for dengue during an outbreak in Machala, Ecuador, in 2010. *BMC Infect Dis*. 2014;14:610.
217. Strauss RA, Castro JS, Reintjes R, Torres JR. Google dengue trends: An indicator of epidemic behavior. The Venezuelan Case. *International journal of medical informatics*. 2017;104:26-30.
218. Cruz CD, Torre A, Troncos G, Lambrechts L, Leguia M. Targeted full-genome amplification and sequencing of dengue virus types 1-4 from South America. *Journal of virological methods*. 2016;235:158-67.
219. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 12):2945-53.
220. OPS/OMS. Dengue in the Caribbean, 1977. Proceedings of a workshop held in Montego Bay, Jamaica, 8-11 May 1978. Washington, D.C. [July 2018]. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19802901694>.
221. Ramos-Castañeda J, Barreto dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1).
222. Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, et al. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 6):1569-75.
223. Rotela C, Fouque F, Lamfri M, Sabatier P, Introini V, Zaidenberg M, et al. Space-time analysis of the dengue spreading dynamics in the 2004 Tartagal outbreak, Northern Argentina. *Acta tropica*. 2007;103(1):1-13.
224. Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1638.
225. Stewart-Ibarra AM, Ryan SJ, Kenneson A, King CA, Abbott M, Barbachano-Guerrero A, et al. The Burden of Dengue Fever and Chikungunya in Southern Coastal Ecuador: Epidemiology, Clinical Presentation, and Phylogenetics from the First Two Years of a Prospective Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2018.



226. Cabrera-Batista B, Skewes-Ramm R, Fermin CD, Garry RF. Dengue in the Dominican Republic: epidemiology for 2004. *Microsc Res Tech*. 2005;68(3-4):250-4.
227. Yamashiro T, Disla M, Petit A, Taveras D, Castro-Bello M, Lora-Orste M, et al. Seroprevalence of IgG specific for dengue virus among adults and children in Santo Domingo, Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(2):138-43.
228. Sharp TM, Hunsperger E, Santiago GA, Munoz-Jordan JL, Santiago LM, Rivera A, et al. Virus-specific differences in rates of disease during the 2010 Dengue epidemic in Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):e2159.
229. Lorenzi OD, Gregory CJ, Santiago LM, Acosta H, Galarza IE, Saint Luke's Acute Febrile Illness Investigation T, et al. Acute febrile illness surveillance in a tertiary hospital emergency department: comparison of influenza and dengue virus infections. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(3):472-80.
230. Ramirez-Vallejo E, Torres JR, Orduna TA, Pina-Pozas M, Vazquez-Vega D, Sarti E. Epidemiological Characteristics of Dengue Disease in Latin America and in the Caribbean: A Systematic Review of the Literature. *F1000Research*. 2017;2017:8045435.
231. Santiago GA, McElroy-Horne K, Lennon NJ, Santiago LM, Birren BW, Henn MR, et al. Reemergence and decline of dengue virus serotype 3 in Puerto Rico. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(6):893-901.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Menores de Edad



IDAMS

"International Consortium on Dengue Risk Assessment,
Management and Surveillance"

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Instituciones Participantes Venezuela: Universidad de Carabobo.

Instituciones Participantes Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Este documento puede tener algunas palabras que quizás usted no conozca o comprenda. Por favor si tiene alguna duda, no dude en preguntar al personal del estudio, nosotros con gusto explicaremos a usted todas las inquietudes que tenga, con el fin que su hijo (a) pueda participar libremente en este estudio. Si desea antes de decidir si su hijo (a) va a participar, conversar con su familia o amigos, puede llevarse una copia de este documento en blanco a su casa. Una vez que usted haya decidido que su hijo (a) va a hacer parte de este proyecto, se le pedirá firmar una copia de este documento. Se le entregarán copias de todos los documentos que usted firmará.

El médico Dr. / Dra. _____ me ha informado verbal y con documento escrito acerca del estudio en el que puede participar mi hijo (a). Me explicó que el virus del dengue (VDEN) se transmite por la picadura de mosquitos de la especie *Aedes*, pero que además pudiesen estar circulando en el país otros virus transmitidos por artrópodos. Se me explicó que en esta investigación se evaluará el grado de excreción del VDEN, u otros arbovirus circulantes, en el suero y su patrón estacional. También se identificará el serotipo del VDEN responsable de los brotes que se produjeron durante el período de estudio. Me ha argumentado debidamente la importancia de la participación de mi hijo (a) en el estudio que pretende identificar la causalidad del VDEN, VCHIK y VZIK en brotes de enfermedad similar a dengue en el área metropolitana del estado de Carabobo.

Me ha dado la oportunidad de reflexionar sobre mi decisión. Entiendo la información que se me ha proporcionado.

Por la presente otorgo voluntariamente mi consentimiento para que mi hijo (a) participe en el *International Consortium on Dengue Risk Assessment, Management and Surveillance*. Se me entregará hoy una copia de este documento firmado para que la conserve.

En el día de hoy, se le realizará una extracción de diez mililitros de sangre a mi hijo (a). Comprendo y conozco los riesgos

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Menores de Edad



Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento sin dar explicación, sin que esto perjudique el derecho a la asistencia médica que mi hijo (a) pueda necesitar en el futuro.

Comprendo los beneficios, las incomodidades y los riesgos del estudio. Tengo derecho a ser notificado de los resultados de los estudios complementarios que se le realizarán a mi hijo (a). Si tengo cualquier preocupación puedo contactar al médico en cualquier momento.

Accedo a que los datos personales de mi hijo (a) y de su enfermedad junto con las muestras clínicas se utilicen en el estudio y que los resultados de la investigación se publiquen sin que se revele la identidad de mi hijo (a).

Declaración sobre el registro y la transmisión de la información médica y sobre la inspección del informe médico:

Otorgo mi consentimiento para que la información médica de mi hijo (a) se pueda registrar confidencialmente en ambas instituciones participantes (Universidad de Carabobo e IPK). Ambas instituciones pueden compartir con la comunidad científica internacional los datos solamente en una forma anónima en la cual no sea posible identificar a mi hijo (a).

Nombre y Apellidos del Niño	C.I	Fecha
Nombre y Apellidos del Padre o Tutor Legal	Firma	Fecha
Nombre y Apellidos del Médico	Firma	Fecha
Nombre y Apellidos del Testigo	Firma	Fecha
Nombre y Apellidos del Testigo	Firma	Fecha

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mayores de Edad



IDAMS

"International Consortium on Dengue Risk Assessment,
Management and Surveillance"

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Instituciones Participantes Venezuela: Universidad de Carabobo.

Instituciones Participantes Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Este documento puede tener algunas palabras que quizás usted no conozca o comprenda. Por favor si tiene alguna duda, no dude en preguntar al personal del estudio, nosotros con gusto explicaremos a usted todas las inquietudes que tenga, con el fin que usted pueda participar libremente en este estudio. Si desea antes de decidir participar, conversar con su familia o amigos, puede llevarse una copia de este documento en blanco a su casa. Una vez que usted haya decidido hacer parte de este proyecto, se le pedirá firmar una copia de este documento. Se le entregarán copias de todos los documentos que usted firmará.

El médico Dr. / Dra. _____ me ha informado verbal y con documento escrito acerca del estudio en el que puedo participar. Me explicó que el virus del dengue (VDEN) se transmite por la picadura de mosquitos de la especie *Aedes*, pero que además pudiesen estar circulando en el país otros virus transmitidos por artrópodos. Se me explicó que en esta investigación se evaluará el grado de excreción del VDEN, u otros arbovirus circulantes, en el suero y su patrón estacional. También se identificará el serotipo del VDEN responsable de los brotes que se produjeron durante el período de estudio. Me ha argumentado debidamente la importancia de mi participación en el estudio que pretende identificar la causalidad del VDEN, VCHIK y VZIK en brotes de enfermedad similar a dengue en el área metropolitana del estado de Carabobo.

Me ha dado la oportunidad de reflexionar sobre mi decisión. Entiendo la información que se me ha proporcionado.

Por la presente otorgo voluntariamente mi consentimiento para participar en el *International Consortium on Dengue Risk Assessment, Management and Surveillance*. Se me entregará hoy una copia de este documento firmado para que la conserve.

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mayores de Edad



En el día de hoy, se me realizará una extracción de diez mililitros de sangre.
Comprendo y conozco los riesgos

Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento sin dar explicación, sin que esto perjudique el derecho a la asistencia médica que pueda necesitar en el futuro.

Comprendo los beneficios, las incomodidades y los riesgos del estudio. Tengo derecho a ser notificado de los resultados de los estudios complementarios que se realizarán. Si tengo cualquier preocupación puedo contactar al médico en cualquier momento.

Accedo a que mis datos personales y de mi enfermedad junto con las muestras clínicas se utilicen en el estudio y que los resultados de la investigación se publiquen sin que se revele mi identidad.

Declaración sobre el registro y la transmisión de la información médica y sobre la inspección del informe médico:

Otorgo mi consentimiento para que la información médica se pueda registrar confidencialmente en ambas instituciones participantes (Universidad de Carabobo e IPK). Ambas instituciones pueden compartir con la comunidad científica internacional los datos solamente en una forma anónima en la cual no sea posible identificarme.

Nombre y Apellidos

Firma

Fecha

Nombre y Apellidos del Médico

Firma

Fecha

Nombre y Apellidos del testigo

Firma

Fecha

Nombre y Apellidos del testigo

Firma

Fecha